

Aus dem
Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. H. Hengel

**Qualitativer und quantitativer Nachweis HCMV-spezifischer Antikörper bei
Patienten nach Blutstammzell-Transplantation mittels eines neuartigen Fcγ-
Rezeptoraktivierungstestverfahrens**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Enver Aliyev

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hengel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Haas

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	10
1.1	Blutstammzelltransplantation	10
1.1.1	Das grundsätzliche Prinzip von Blutstammzelltransplantation	10
1.1.2	Quellen für (Blut)Stammzellen	11
1.1.3	Spender-Empfänger Komplikationen.....	12
1.1.4	Posttransplantationskomplikationen.....	12
1.1.4.1	Graft-vs-Host-Disease (GvHD).....	13
1.1.4.2	Komplikationen durch Infektionskrankheiten	13
1.2	Die Cytomegalovirusinfektion als klinisch relevante Posttransplantationsinfektion	14
1.2.1	Definition	14
1.2.2	Epidemiologie	15
1.2.3	HCMV-Transmission.....	15
1.2.4	Klinische Formen und Verlauf der HCMV-Infektion	16
1.2.5	Diagnostik.....	17
1.2.6	Therapie	17
1.2.7	Problem der Resistenz gegenüber Virostatika.....	18
1.2.8	HCMV-Reinfektionswahrscheinlichkeit	18
1.3	HCMV und das Immunsystem	19
1.3.1	Das Immunsystem.....	19
1.3.1.1	Allgemeine Prinzipien des Aufbaus des Immunsystems	19
1.3.1.2	Antikörper: Rolle, Bedeutung und Funktionen.....	20
1.3.2	HCMV und die Immunantwort: Persistenz, Reaktivierung und antivirale Immunantwort.....	23
1.3.2.1	Immunkompetente Zellen als Reservoir für latentes HCMV	23
1.3.2.2	Zelluläre Immunantwort bei HCMV	25
1.3.2.2.1	CD8 ⁺ -Lymphozyten	25
1.3.2.2.2	CD4 ⁺ -Lymphozyten	26
1.3.2.2.3	B-Lymphozyten	26
1.3.2.2.4	NK-Zellen: Antikörperunabhängige und antikörperabhängige Mechanismen der Aktivierung .	27
1.3.2.2.4.1	Antikörperunabhängiger Mechanismus der NK-Zellaktivierung.....	27
1.3.2.2.4.2	Antikörperabhängiger Mechanismus der NK-Zellaktivierung: Fcγ-Rezeptoren und ADCC	
	29	
1.3.3	Antikörper und CMV-Infektion	32
1.3.3.1	Neutralisierende Antikörper	32
1.3.3.2	Zytotoxische Antikörper.....	34
2	ZIEL DER ARBEIT	36

2.1	Arbeitsplan	37
3	MATERIALIEN UND METHODEN	38
3.1	Materialien, Geräte	38
3.1.1	Zellkulturen	38
3.1.2	Methodenverbrauchsmaterialien, Geräte, Software	39
3.1.2.1	PCR	39
3.1.2.2	IL-2 ELISA	41
3.1.2.3	AEC-Färbung	42
3.1.2.4	ELISA	42
3.1.2.5	Durchflusszytometrie (FACS)	43
3.2	Methoden	44
3.2.1	Zellkulturen und Patientenmaterial	44
3.2.1.1	Zellkultivierung	44
3.2.1.2	Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer	45
3.2.1.3	Cryokonservieren von Zellen	45
3.2.1.4	Auftauen von Zellen	46
3.2.1.5	Serenvorbereitung	46
3.2.2	Nachweisverfahren	46
3.2.2.1	Nachweis der HCMV-Virämie	46
3.2.2.1.1	PCR (<i>Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction</i>)	46
3.2.2.1.1.1	Das Prinzip des Nachweises	47
3.2.2.1.1.2	Durchführung des Nachweisverfahrens	47
3.2.2.2	Antikörpernachweisverfahren	48
3.2.2.2.1	Nachweis CD16-aktivierender Antikörper	48
3.2.2.2.1.1	Das Prinzip des Nachweises	48
3.2.2.2.1.2	Durchführung des Fc γ -Rezeptoraktivierungstestverfahren (BW-Assay)	50
3.2.2.2.1.3	IL-2 ELISA („Sandwich“ ELISA)	51
3.2.2.2.1.4	Auswertung	52
3.2.2.2.2	Neutralisationstest	53
3.2.2.2.2.1	Das Prinzip des Nachweises	53
3.2.2.2.2.2	Durchführung des Tests	53
3.2.2.2.2.3	AEC – Färbung	54
3.2.2.2.2.4	Auswertung	55
3.2.2.2.3	ELISA – Anti CMV-IgG (Enzygnost, DADE Behring)	55
3.2.2.2.3.1	Das Prinzip des Nachweises	55
3.2.2.2.3.2	Durchführung des Nachweisverfahrens	55
3.2.2.3	Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen	57
3.2.2.3.1	Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated Cell Sorting, Flow Cytometry)	57
3.2.2.3.1.1	Das Prinzip des Nachweises	57

3.2.2.3.1.2	Durchführung des Nachweisverfahrens	57
3.2.3	Methodologische Voraussetzungen der Durchführung der Nachweisverfahren	58
3.2.3.1	Vortest	58
3.2.3.2	Vergleich der Antikörperfraktionen: Cytotect®-Koeffizient.....	58
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Evaluation des CD16-Aktivierungstests	60
4.1.1	Antikörperkonzentrationsabhängigkeit	60
4.1.2	Infektionsspezifität.....	61
4.1.3	Zeitabhängige Antigenexpression	62
4.2	Patienten und Probanden der Kontrollgruppe	64
4.2.1	Darstellung der Messwerte.....	64
4.2.2	Probanden der Kontrollgruppe.....	66
4.2.2.1	Schlussfolgerungen.....	68
4.2.3	Tabellarische Übersicht über die Patientenkohorte	68
4.2.4	Analyse der HCMV-IgG-Antworten bei Patienten in der virämischen Phase	70
4.2.4.1	Patient 1	72
4.2.4.2	Patient 2	72
4.2.4.3	Patient 3	73
4.2.4.4	Patient 4	73
4.2.4.5	Patient 5	73
4.2.4.6	Patient 6	74
4.2.4.7	Schlussfolgerungen.....	74
4.2.5	Analyse der HCMV-IgG-Antworten bei Patienten in der postvirämischen Phase	76
4.2.5.1	Patient 7	78
4.2.5.2	Patient 8	78
4.2.5.3	Patient 9	79
4.2.5.4	Patient 10	80
4.2.5.5	Patient 11	80
4.2.5.6	Patient 12	81
4.2.5.7	Schlussfolgerungen.....	82
5	DISKUSSION	83
5.1	Einfluss durch CMV-spezifische Behandlungsverfahren der Patienten	83
5.1.1	Antivirale Therapie	83
5.1.2	Intravenöse Immunglobulinpräparationen (IVIG)	83
5.2	Diskussion der erhaltenen Ergebnisse	84
5.2.1	HCMV-Virämie	84

5.2.2	Untersuchung der Antikörperbildung.....	85
5.2.2.1	HCMV-seropositive Kontrollgruppe	85
5.2.2.2	Patienten	85
5.2.3	Korrelation der Antikörperbildung mit Lymphozytenzahlen	87
5.3	Immunglobulinpräparationen als Quelle von therapeutischen CMV-Antikörpern	88
5.4	Perspektiven	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	LITERATUR.....	93
8	DANKSAGUNG	104
9	LEBENS LAUF	105

Liste der verwendeten Abkürzungen:

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AA	Aplastische Anämie
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AEC	amino-ethyl-carbazole
Ag	Antigen
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Ak	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
BCR	B-Zellrezeptor
BW-Assay	Fcγ-Rezeptoraktivierungs-Testverfahren
BW-Zelle	BW5147-Zelle
ca.	cirka, zirka
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cFcγ-Rezeptor	Chimäres Fcγ-Rezeptor
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus; Zytomegalievirus
d.h.	das heißt
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, resp. DNS	desoxyribonucleic acid, Desoxyribo[se]nukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleinsäuretriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i>
et al.	<i>Lat. et alia</i> (und andere)
Fab	<i>fragment antigene binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment cristalizable</i>
FCS, FKS	<i>foetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
FcγR	Fcγ-Rezeptor
G	Zentrifugationskraft, Gravitation, Erdbeschleunigung
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
h	Stunde
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HHV	humanes Herpesvirus

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen complex</i>
hpi	<i>hours postinfection</i> , Stunden nach Infektion
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-2	Interleukin-2
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
KAR	<i>killer activating receptor</i>
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
KMT	Knochenmarktransplantation
Lymph	Lymphozyt(en)
M	Mol
MCMV	Mauscytomegalovirus
µg	Mikrogramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NK	natürlicher Killer (Killer-Zelle)
nm	Nanometer
NT	Neutralisationstest
OD	<i>optical density</i> (optische Dichte)
PAA	Phosphonoessigsäure
PBMZ	periphere Blutmononuklearzelle
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBSCT	<i>Peripheral Blood Stem Cell Transplantation</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFU	<i>plaque forming unit</i>
pg	Picogramm
pH	$-\log [H^+]$, negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der H^+ -Teilchen
POD	Peroxidase
Prä-T-ALL	Prä-T-akute lymphatische Leukämie
Pro-B-ALL	Pro-B-akute lymphatische Leukämie
resp.	respektive
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i>
sek. AML	sekundäre akute myeloische Leukämie
sog.	so genannte
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
vs.	<i>versus</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Infektionen mit Cytomegaloviren (CMV) spielen in der Medizin eine wichtige Rolle. Durch die hohe Durchseuchung in der Bevölkerung, die lebenslange Persistenz des Erregers, seinen breiten Zelltropismus *in vivo* und seine Virulenzeigenschaften reiht sich dieses Virus unter den relevanten humanpathogenen Erregern ein.

Epidemiologischen Studien in der modernen Onkologie zeigen, dass sich die Zahl von Tumorerkrankungen in der Population stetig erhöht. Der rasante Fortschritt in der Transplantationsmedizin hat dazu geführt, dass jährlich eine große Zahl von Transplantationen durchgeführt wird (Bortin et al., 1992; Buchholz and Ganser, 2009). Bei Patienten mit bösartigen hämatologischen Neoplasien, Organ- und Stammzelltransplantationen, primären und sekundären Immundefizienzen und HIV-Infektionen ist es notwendig, dass Ärzte und Wissenschaftler gleichermaßen über etwaige CMV-Reaktivierungen nachdenken, da eben jene CMV-Infektionen und Reaktivierungen und die daraus resultierenden Komplikationen über die klinische Situation der Patienten entscheiden können. Trotz vieler Studien bleibt das Problem in vieler Hinsicht unverstanden und eine effektive CMV-Impfung ist nicht in Sicht, was weitere Untersuchungen in der Klinik und in der Grundlagenforschung unbedingt erforderlich macht.

1.1 Blutstammzelltransplantation

Blutstammzelltransplantationen (HSZT, engl. HSCT, PBSCT) werden seit 1980 durchgeführt (Soiffer, 2004). Anfänglich (sowie teilweise auch heutzutage) wurde mit der kompletten Knochenmarktransplantation (KMT) begonnen. Die Suche nach effektiven Behandlungsmethoden für bösartige hämatologische Erkrankungen und erste positive Resultate nach Transplantationen haben die Forschung in diesem Bereich intensiviert und eine Überleitung in die praktische Medizin ermöglicht. In Verbindung mit Chemotherapien, die ursprünglich als Hauptbehandlungsmethode Anwendung fanden und das Überleben der Patienten mit Malignomerkrankungen ermöglicht haben, ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation heutzutage eine effiziente Methode geworden, die in einigen Fällen die komplette Genesung sichert.

1.1.1 Das grundsätzliche Prinzip von Blutstammzelltransplantation

Bei Leukämien existieren bösartig veränderte Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut, die unreguliert und unkontrolliert wachsen. Um diese Zellen zu zerstören, werden hochdosierte

Chemotherapeutika, sowie Zytostatika verabreicht (Prentice, 1983), die das Zellwachstum verhindern und proliferationsaktive Zellen abtöten. Ein Problem ist hierbei, dass gleichzeitig auch gesunde Knochenmarkzellen, einschließlich der Knochenmarkstammzellen, zerstört werden. Leider ist noch keine Methode (oder Medikament) verfügbar, die selektiv Tumorzellen abtöten kann. Die chemotherapeutische Ablation der Knochenmarkszellen wird Konditionierung genannt. Anschließend hat der Patient keine funktionellen Knochenmarkszellen mehr.

Um die Blutbildung wiederherzustellen, wird dem Patienten anschließend ein Transplantat eines gesunden Spenders verabreicht (Copelan, 2006), welches Blutstammzellen enthält. Dies sind $CD34^+$ Blutstammzellen, die sich anschließend in alle Zellen der hämatopoetischen Linie differenzieren können und so die gesamte Blutbildung des Patienten rekonstituieren können. Die Transplantationssituation stellt aus immunologischer Sicht eine interessante Konstellation dar: Durch die Ablation des blutbildenden Systems wird das immunologische Gedächtnis des erlernten Immunsystems entfernt. Anschließend wird das immunologische Gedächtnis des Donors auf den Empfänger übertragen, sofern Gedächtnis B – und T – Zellen im Transplantat enthalten sind. Da viele Pathogene nicht nur in Blut- oder Blutvorläuferzellen persistieren, werden die Pathogene durch die Konditionierung nicht eliminiert. Wenn der Spender also kein immunologisches Gedächtnis bereitstellen kann (wenn er selbst nicht mit dem Pathogen infiziert ist), kommt es zu einer Situation, die einer „erneuten Primärinfektion“ gleicht.

1.1.2 Quellen für (Blut)Stammzellen

Blutstammzellen sind Zellen, aus denen sowohl Blut-Vorläuferzellen, als auch reife resp. funktionelle Blutzellen entstehen. Reife Blutzellen haben eine begrenzte Lebensdauer, wohingegen die Blutstammzellen sich unbegrenzt vermehren können und somit die kontinuierliche Neubildung der neuen Blutzellen sichern. Immunphänotypisch ist der $CD34^+$ -Marker auf den Zellen zu finden, was bei der Anreicherung dieser Zellen verwendet wird (Copelan, 2006).

Blutstammzellen können aus verschiedenen Quellen gewonnen werden. Vor allem werden sie heute aus dem peripheren Blut von gesunder Donoren entnommen (Copelan, 2006). Durch eine Methode, die sog. Cytapherese, werden aus dem peripheren Blut des Spenders Blutvorläuferzellen gewonnen. Das periphere Blut enthält allerdings nur sehr wenige Vorläuferzellen. Um die Zahl dieser Zellen zu vermehren, bekommen die Spender Medikamente verabreicht, die die Leukozytenfraktion des Knochenmarks mobilisieren und so die Zellzahl im peripheren Blut erhöhen, wie G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) (Copelan, 2006) oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor).

Eine weitere Stammzellquelle ist das Nabelschnurblut (Copelan, 2006; Brunstein et al., 2007). Die Vorläuferzellen befinden sich im Nabelschnurblut von Neugeborenen. Sie sind technisch leicht auszusortieren und können leicht konserviert werden.

Das Knochenmark ist die dritte Quelle, aus der man Blutvorläuferzellen gewinnen kann (Prentice, 1983; Copelan, 2006). Zurzeit werden in der Erwachsenenhämatologie hauptsächlich Stammzellen aus dem peripheren Blut verwendet.

1.1.3 Spender-Empfänger Komplikationen

Um eine Transplantation erfolgreich und mit möglichst wenigen Komplikationen durchführen zu können, müssen Empfänger und Spender immungenetisch so gut wie möglich zu einander passen (Copelan, 2006). Abgesehen von monozygoten Zwillingen sind keine zwei Individuen immunologisch identisch. Dieses Phänomen basiert letztendlich auf Genen, die für bestimmte, ganz individuelle und einzigartige Antigenkombinationen verantwortlich sind und für die so genannte MHC-Antigene (*major histocompatibility complex*) kodieren (Copelan, 2006). Die Produkte dieser Gene sind besondere Proteine, die den HLA-Komplex bilden (*human leukocyte antigen complex*), der von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentiert wird. Die HLA-Gene werden normal vererbt und sind deshalb bei Verwandten ähnlich resp. gleich, unterscheiden sich aber bei Nichtverwandten sehr deutlich. Wenn das Transplantat immunologisch gut passt, verläuft die Posttransplantationsphase bzw. die Rekonstitution deutlich besser, ansonsten ist häufig eine Abstoßungsreaktion bzw. GvHD (Graft versus Host Disease) zu beobachten (Petersdorf et al., 1997).

1.1.4 Posttransplantationskomplikationen

Trotz einer hohen immunologischen Transplantatähnlichkeit wird nach einer Transplantation relativ häufig eine mehr oder weniger ausgeprägte Abstoßungsreaktion beobachtet. Weil diese Reaktion eine immunologische Reaktion ist, werden entsprechende Medikamente, wie z.B. Zytostatika, Glykokortikoide verabreicht, um die Immunreaktion des Wirtes gegen das Transplantat bzw. GvHD abzuschwächen (Prentice, 1983; Copelan, 2006). Diese Medikamente hemmen Funktionen der immunkompetenten Zellen und dadurch letztendlich die Abstoßung. Sie reduzieren aber auch die Fähigkeit des Empfängers sich erfolgreich mit Pathogenen auseinander zu setzen.

1.1.4.1 Graft-vs-Host-Disease (GvHD)

Nach Transplantationen werden so genannte „Transplantat gegen Wirt“-Erkrankungen beobachtet (Teshima and Ferrara, 2004). Da ein Transplantat relativ viele T-Lymphozyten enthalten kann, können diese Lymphozyten nach der Transplantation Zellen und Gewebe des Empfängers als fremd erkennen und attackieren. Meistens werden Knochenmarkzellen, Hautzellen, Zellen des Darmtrakts, Hepatozyten oder Zellen der Lungen beschädigt. Die Bedingungen, die für diese Komplikationen prädisponieren, sind (Teshima and Ferrara, 2004):

- a) Der Empfänger ist vollständig immunsupprimiert.
- b) Es bestehen starke Unterschiede zwischen den HLA-Komplexen von Spender und Empfänger.
- c) Das Transplantat enthält immunkompetente Zellen.

Um diese Komplikation zu verhindern, werden die T-Zellen in vielen Fällen vor der Transplantation im Transplantat depletiert.

1.1.4.2 Komplikationen durch Infektionskrankheiten

Diese Komplikationen haben ebenfalls eine große Bedeutung nach einer Transplantation (Goerner et al., 1999; Abraham et al., 1998; Ben Salah et al., 2005; Maeda et al., 2001). Bei der notwendigerweise verabreichten, starken Immunsuppression können opportunistische Erreger und insbesondere persistierende Viren nicht mehr durch das Immunsystem kontrolliert werden und es kommt zu Reaktivierungen. Da die bisher verfügbaren Virostatika nicht gegen alle Viren effektiv sind und teilweise starke Nebenwirkungen haben (wie z.B. myelosuppressiver Effekt, Einfluss auf Nierenfunktionen), kommt es zu einer beträchtlichen Letalität bei diesen Komplikationen.

Es wurde gezeigt, dass zwei Virengruppen bei Patienten nach Stammzelltransplantationen besonders wichtig sind. Die erste Gruppe sind die Viren, die zur Familie der Herpesviren gehören und durch ihre hohe Durchseuchung in der Bevölkerung in sehr vielen Patienten latent vorhanden sind. Außer HCMV sind hier das Epstein-Barr Virus (EBV), Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster Virus und auch die humanen Herpesviren 6, 7 und 8 (HHV-6, 7, 8) zu nennen. Die zweite Gruppe ist die taxonomisch heterogene Gruppe der respiratorischen Viren, wie z.B. RSV, Parainfluenza- und Adenoviren.

Es wurde gezeigt, dass die Familie der Herpesviren die folgenden besonderen Eigenschaften aufweist, die diese Viren zu den klinisch effektiven Pathogenen nach Stammzelltransplantationen macht (Baden and Rubin, 2004).

1. Latenz. Das Virus infiziert Menschen oft schon während der Kindheit, wobei die Primärinfektion in vielen Fällen asymptomatisch verlaufen kann. Obwohl die Infektion durch das Immunsystem kontrolliert wird, verbleibt das Virus jedoch lebenslang im Organismus und kann sporadisch reaktivieren. Für HCMV wurde beschrieben, dass bei Reaktivierungen TNF (*tumor necrosis factor*) und Katecholamine eine wichtige Rolle spielen (Baden and Rubin, 2004).
2. Eine primäre Infektion ist durch viele Expositionsergebnisse möglich. Außerdem sind Blutkonserven, die für die Behandlung verwendet werden, eine potenzielle Infektionsquelle.

EBV kann zusätzlich als onkogenes Virus wirken. Das heißt, dass EBV mit einer lymphoproliferativen Posttransplantationserkrankung assoziiert ist, wobei eine gleichzeitig klinisch manifestierte HCMV-Infektion die Wahrscheinlichkeit dieser Erkrankung noch zusätzlich erhöht (Baden and Rubin, 2004).

1.2 Die Cytomegalovirusinfektion als klinisch relevante Posttransplantationsinfektion

1.2.1 Definition

Cytomegalovirus (humanes Cytomegalievirus, HCMV) gehört zur β -Subgruppe der Herpesviren. Der Name "Cytomegalie" leitet sich von einer Eigenschaft des Virus ab: Bei infizierten humanen Zellen ist eine typische Zellvergrößerung zu beobachten. Der Name leitet sich von zwei griechischen Worten ab: „kytos“-Zelle, „megalo“-groß). Das Virus wurde in den 50er-Jahren entdeckt. Bis heute hat sich keine deutsche Bezeichnung für die Erkrankung durchgesetzt. Das Cytomegalovirus ist eines von acht humanpathogenen Herpesviren (HHV) und wird auch als HHV-5 bezeichnet (<http://www.icon-cmv.de/de/Eltern/WasistCytomegalie/page.html>).

HCMV enthält ein großes, lineares, doppelsträngiges DNA-Genom (~ 235 kb), das für mehr als 200 Proteine kodiert. Die virale Genexpression ist kaskadenartig reguliert (*immediate early-early-late*) (Mertens et al., 2004). Unter den Proteinen, die dabei exprimiert werden, gibt es bestimmte Proteine, die immundominant sind und für die zelluläre und humorale Immunantwort relevant sind. Um die Bedeutung und Rolle des Virus in der Immunantwort zu verstehen, werden in folgenden Kapiteln einige Besonderheiten von HCMV zusammengefasst.

1.2.2 Epidemiologie

Erste Beschreibungen von HCMV-Infektionen wurden schon Anfang des 19. Jahrhunderts veröffentlicht (Jesionek and Kiolemenoglou, 1904; Ribbert, 1904; Goodpasture and Talbot, 1921; Cole and Kuttner, 1926). Es wurden insbesondere pathohistologische Befunde bei Neugeborenen erhoben, die aufgrund einer viralen Infektion verstorben waren, die als mögliche HCMV-Infektion interpretiert wurde. Es gibt Befunde, die zeigen, dass eine HCMV-Infektion relativ häufig vorkommt und bei Neugeborenen zu Schäden des Nervensystems führen kann (Stagno et al., 1977; Pass et al., 1980; Williamson et al., 1982).

HCMV ist ein ubiquitäres Virus. Es ist praktisch in allen Regionen der Welt nachzuweisen, wobei die Seroprevalenz bei Erwachsenen zwischen 40 und 100 % der Population variiert (Alford et al., 1981; Krech and Tobin, 1981; Gold and Nankervis, 1982). Einige Studien haben gezeigt, dass in Regionen wie Ostasien, Indien und Südamerika bereits 90% der Vorschulkinder mit HCMV infiziert sind (Stagno, 2001). Demgegenüber sind weniger als 20% der Kinder eines vergleichbaren Alters in den USA und in Großbritannien HCMV-seropositiv. Beobachtungen zur altersabhängigen Verteilung der HCMV-Seroprevalenz (z.B. in einer Studie aus Parma (Italien)) haben gezeigt, dass eine Steigerung der Seroprevalenz von 28% bei 2-Jährigen auf 96% bei den in 45-54 jährigen Personen zu beobachten ist (Natali et al., 1997). Regionale Blutspenderuntersuchungen in Asien und Afrika haben gezeigt, dass der Prozentsatz von HCMV-seropositiven Personen hier zwischen 95 und 100% liegt. Die Seroprevalenz bei Blutspendern in Deutschland liegt je nach Alter der Spender zwischen 30% (im Alter 18-20 Jahre) und über 70% (älter als 65 Jahre) (Hecker et al., 2004).

1.2.3 HCMV-Transmission

Grundsätzlich können Speichel, Muttermilch, Urin, Blutkomponente und Zervixsekret Infektionsquellen darstellen. Da beschrieben wurde, dass die HCMV-Infektion erstmalig im Kindesalter nachweisbar ist, sollen im Folgenden einige interessante Daten erwähnt werden, die dieses Phänomen näher beleuchten.

Es zeigt sich, dass Neugeborene HCMV von ihrer Mutter perinatal oder mit der Muttermilch bekommen (Dworsky et al., 1983; Bryant et al., 2002). Die Infektion kann aber auch von einem Kind zum anderen übertragen werden. Eine Studie beschreibt 37 Kinder, die am Anfang der Studie HCMV-seronegativ getestet worden waren und in einem gemeinsamen Kindergarten betreut wurden. Bei der Folgeuntersuchung nach nur 6-12 Monaten konnte das HCMV bei 50% der Kinder in Urin oder Speichel nachgewiesen werden (de Mello et al., 1996). Ähnliche

Ergebnisse wurden von anderen Studien bestätigt. Hier wurde gezeigt, dass das HCMV bei solchen Kindern, die einen Kindergarten besucht haben, viermal häufiger nachgewiesen wurde als bei Kindern, die keinen Kindergarten besucht haben (Adler, 1985; Hutto et al., 1985).

Aus klinischer Sicht sind die folgenden HCMV-Transmissionen relevant:

- 1) Allogene Transplantationen
- 2) Übertragung über Blutkomponenten

So wurde z.B. eine Infektion durch Bluttransfusion nach einer Operation bei transplantierten kardiochirurgischen Patienten dokumentiert. Es wurden auch Fieber, Splenomegalie, erhöhte Lebertransaminasen, Lymphozytose und Mononukleose beschrieben (Holswade et al., 1963; Reyman, 1966; Paloheimo JA et al., 1968). Spätere Studien haben gezeigt, dass eine HCMV-Infektion in ca. 50% aller Fällen eine Rolle spielte, und es wurde geschlussfolgert, dass das HCMV wahrscheinlich bei der Transfusion übertragen wurde (Prince et al., 1971).

Außerdem wurden auch transfusionsmengenabhängige und blutkomponentenabhängige Transmissionswahrscheinlichkeiten errechnet. Dabei wurde gezeigt, dass die Transmissionswahrscheinlichkeit bei erhöhten Mengen des transfundierten Blutes entsprechend erhöht ist (Britt, 2007). Andererseits ist die Häufigkeit der Posttransfusionsinfektion mit HCMV mit der Zahl der übertragenen Blutzellen positiv korreliert, d.h. dass die HCMV-Infektionswahrscheinlichkeit bei allogenen Transplantationen mit einer hohen Zahl an enthaltenen Leukozyten oder Thrombozyten im Transplantat nachweislich erhöht ist (Britt, 2007).

Weitere Studien in diese Richtung haben gezeigt, dass die Verwendung von verschiedenen Filtern für die zweckgebundene Selektion der im Transplantat enthaltenen Leukozyten sowie die Verwendung von hochreinen Erythrozyten-Präparationen zur Verminderung der Posttransfusionsinfektion führt (Brady et al., 1984; Bowden et al., 1991; Ljungman et al., 2002). Die HCMV-Serostatusnachweise bei Spendern und Empfängern haben dementsprechend zu einer wesentlichen Reduktion der Posttransfusionsinfektion geführt (Bowden et al., 1991; Bowden, 1995).

1.2.4 Klinische Formen und Verlauf der HCMV-Infektion

Bei Primärinfektionen beträgt die Inkubationszeit ca. 20-60 Tage. Bei immunkompetenten Patienten wird meist ein asymptomatischer Verlauf beobachtet. Außer Retinitis ist die Diagnose einer HCMV-Erkrankung klinisch häufig nicht zu stellen. Gelegentlich ist eine Mononukleose-ähnliche Symptomatik zu beobachten (Mertens et al., 2004).

Bei immunkompromittierten Menschen (z.B. Patienten mit HIV-Infektionen oder nach Transplantationen) wird ein breites Spektrum HCMV-bedingter Symptome beobachtet. Man unterscheidet die folgenden, jeweils häufig vorkommenden, klinischen Formen: Pneumonitis, gastrointestinale Komplikationen (Hepatitis und/oder Kolitis), Knochenmarks-Disfunktion, Retinitis, Vitreitis, Encephalitis und demyelinisierende Entzündungsneuropathie. Eben diese Komplikationen verursachen die hohe Letalität. Die häufigste Ursache dabei ist die Pneumonitis. In der Vorvirostatika-Ära erreichte diese Komplikation eine Letalität von bis zu 80% und wird heutzutage bei 10-15% aller Transplantierten beobachtet (Wills et al., 2007).

1.2.5 Diagnostik

Zurzeit werden folgende diagnostische Methoden verwendet (Mertens et al., 2004).

Eine länger bestehende HCMV-Infektion kann durch IgG-Antikörper-Nachweisverfahren festgestellt werden (ELISA, IFT). Bei Primärinfektion und/oder Reaktivierung können in den ersten 2-3 Monaten außerdem IgM-Antikörper detektiert werden (Mertens et al., 2004).

Verbreitet sind auch die folgenden beiden direkten Virusnachweisverfahren im Fall einer aktiven HCMV-Infektion: Direkte Anzucht von HCMV aus dem klinischen Material in der Zellkultur und/oder ein quantitativer Virus-DNA-Nachweis des viralen DNA-Genoms aus Blutzellen, Geweben, Speichel oder Urin mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR).

1.2.6 Therapie

Als Medikamente wird eine Reihe von Virostatika wie z.B. Ganciclovir (Valganciclovir) verabreicht (Mertens et al., 2004). Um seine antivirale Wirkung entfalten zu können, muss dieser Wirkstoff zum Triphosphat phosphoryliert werden. Die erste Phosphorylierung, die zum Ganciclovir-Monophosphat führt, erfolgt durch die virale Phosphotransferase pUL97 und ist somit auf infizierte Zellen limitiert. Danach wird das Monophosphat durch Kinasen der Wirtszelle über das Diphosphat zum Triphosphat phosphoryliert.

Im Gegensatz zum Ganciclovir braucht das Cidofovir keine viruskodierte Kinasen und wird ausschließlich von Enzymen der Wirtszelle phosphoryliert. Die Spezifität für HCMV beruht hier auf der viralen DNA-Polymerase, die Cidofovir (im Gegensatz zu den zellulären DNA-Polymerasen) als Nukleotid akzeptiert.

Ein weiteres anti-HCMV Virostatikum ist Foscarnet. Dieses Virostatikum benötigt keine initiale intrazelluläre Aktivierung. Der Mechanismus des Wirkstoffes ist die Inhibition der Abspaltung

von Pyrophosphat aus dNTPs durch Blockierung die Phosphatbindungsstelle der viralen DNA-Polymerase (Mertens et al., 2004).

Für diese Virostatika sind eine Reihe von Nebenwirkungen, wie z.B. Leukozytopenie (eine Verminderung der weißen Blutkörperchen) und Thrombozytopenie für Ganciclovir, renale und metabolische Toxizität für Foscarnet, Nephrotoxizität für Cidofovir, beschrieben (Mertens et al., 2004). Dies kann die Verwendung dieser Virostatika in besonderen klinischen Fällen (z.B. Ganciclovir wegen seines myelosuppressiven Effekts bei einer ausgeprägten Panzytopenie nach der durchgeführten Konditionierung und in der früheren Zeit nach Stammzelltransplantation) einschränken.

1.2.7 Problem der Resistenz gegenüber Virostatika

Die Resistenzentwicklung ist ein vordringliches klinisches Problem. Mutationen des HCMV-Genoms führen dazu, dass das Virus gegenüber einem oder mehreren Virostatika eine Unempfindlichkeit (Resistenz) entwickelt. So kann z.B. Ganciclovir durch Mutationen im *UL97*-Gen nicht mehr phosphoryliert werden. Hinsichtlich Cidofovir und Foscarnet wurden resistenzverursachende Mutationen im viralen Polymerasegen (*UL54*) festgestellt.

1.2.8 HCMV-Reinfektionswahrscheinlichkeit

Schon im Jahre 1984 (Drew et al., 1984) und auch später (Chern et al., 1998) wurde nachgewiesen, dass in HIV-infizierten Patienten nicht nur ein einziger, sondern mehrere genetisch unterschiedliche HCMV-Stämme detektiert werden können. Gleichzeitig wurde beschrieben, dass eine HCMV-Reinfektion bei immunsupprimierten Patienten möglich ist (Chou, 1986; Chou, 1987; Grundy et al., 1988).

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch gesunde HCMV-infizierte seropositive Kinder mit einem anderen HCMV-Stamm erneut infiziert werden konnten. Einige Autoren konnten auch zeigen, dass in einer reinen Frauenkohorte serologisch unterschiedliche HCMV-Stämme bei derselben Person nachgewiesen werden können (Boppana et al., 2001). Sie heben auch hervor, dass diese Nachweise mit der Untersuchungsmöglichkeit nur auf zwei serologisch unterschiedliche Antikörperspezifitäten begrenzt worden sind und dass sich Frauen relativ häufig mit weiteren HCMV-Stämmen reinfizieren (Boppana et al., 2001).

Alle diese Befunde bezüglich der Möglichkeit einer HCMV-Zweit- oder Reinfektion zeigen deutlich, dass die adaptive Immunantwort zwar vorhanden ist (bei gesunden Menschen), HCMV

aber nicht eliminieren oder eine erneute Infektion nicht verhindern kann. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich hauptsächlich auf der Fähigkeit der effizienten Immunevasion von HCMV (Übersichtsartikel: Hengel et al., 1998).

1.3 HCMV und das Immunsystem

1.3.1 Das Immunsystem

1.3.1.1 Allgemeine Prinzipien des Aufbaus des Immunsystems

Die adaptive Immunität wird konventionell in die zelluläre und die humorale Immunantwort eingeteilt. Diese Einteilung ist nur bedingt sinnvoll, da alle Komponenten des Immunsystems bei einer gegebenen Immunantwort eng interagieren und die Einzelkomponenten eng verzahnt sind, da die Einzelbereiche nur gemeinsam einen effektiven Schutz vor Pathogenen gewährleisten können. Es ist bekannt, dass das Immunsystem Fremd von Selbst unterscheiden kann, d.h. dass das System letztendlich die genetische Identität sichert. Eine Vielzahl von potenziell gefährlichen, körperfremden Agenzien kann mit einem Organismus in Kontakt treten. Wenn diese Faktoren in den Organismus eindringen können, müssen sie durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Dafür stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung.

Sobald ein Antigen es schafft, die ersten physikalischen Barrieren (wie z.B. Haut und Schleimhaut) zu überwinden, kommt es zwangsläufig mit Zellen des Immunsystems in Kontakt. In allen Geweben sitzen spezialisierte Zellen, deren Aufgabe es ist, potentielle Antigene zu erkennen und aufzunehmen. Von diesen Zellen wird das Antigen anschließend den Immunzellen „präsentiert“. Dafür sind so genannte dendritische Zellen (DCs) zuständig. Nach der Phagozytose werden antigenspezifische Peptide auf der Oberfläche der DCs präsentiert (Abb. 1). Danach interagieren die DCs in Lymphknoten mit T-Zellen, was es den T-Zellen ermöglicht die Antigene zu erkennen. Nach der Antigenerkennung proliferieren die T-Zellen und produzieren verschiedene immunstimulatorische Zytokine. Zytotoxische T-Zellen können dann letztendlich die Zerstörung der infizierten Zelle einleiten. Neben der zellulären Immunantwort existiert zusätzlich die sog. humorale Immunantwort, die hauptsächlich von B-Lymphozyten und ihren Produkten gebildet wird. B-Zellen erkennen Antigene spezifisch über eine Bindung zwischen dem B-Zellrezeptor und dem passenden Epitop. Die lösliche Form des B-Zellrezeptors ist der sog. Antikörper. Nachdem B-Zellen ein Epitop des Antigens gebunden haben, können insbesondere solche B-Zellen (mit der Hilfe besonderer T-Lymphozyten [sie werden deswegen „T-Helfer“ genannt]) proliferieren, die das Epitop spezifisch binden können. Die Antikörper

können anschließend das Epitop auf dem Antigen binden und danach verschiedene Mechanismen (Neutralisation, komplementabhängige und komplementunabhängige Zytotoxizität) auslösen. Der Fakt, dass ein Pathogen viele potenzielle Antigene mit unterschiedlichen Epitopen exprimiert, gegen die verschiedene B-Zellklone Antikörper bilden können, führt dazu, dass die gebildete Antikörperantwort gegenüber einem einzelnen Pathogen polyklonal ist. (Abb. 1, 2).

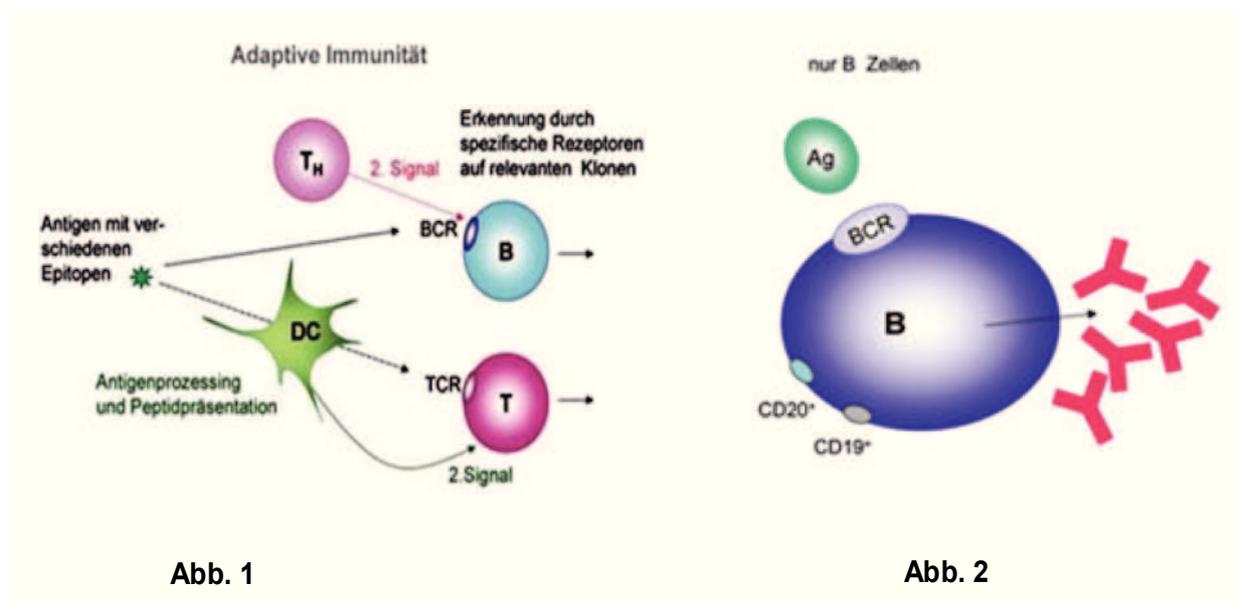


Abb. 1, 2. Darstellung verschiedener Wege der Antigenerkennung
 (Quelle: http://www.medizin.uni-greifswald.de/immun/broschuere_marseille.html)
 DC- Dendritische Zelle; T-Lymphozyt
 TCR-T-Zellenrezeptor; B-B-Lymphozyt
 BCR-B-Zellenrezeptor; Th-T-Helfer;
 CD20+, CD19+ Rezeptoren des B- Lymphozyten

Antigene werden durch DCs erkannt, aufgenommen, prozessiert und auf der DC-Oberfläche präsentiert. Dann werden die Antigene durch den TCR auf den T-Zellen erkannt. Epitope eines Antigens können durch B-Lymphozyten erkannt werden, was zur Stimulation der BCR auf den B-Lymphozyten und Produktion eines, für ein bestimmtes Epitop spezifischen, löslichen Antikörpers führt. Die T-Helfer (T_H) können die Antikörperbildung verstärken (stimulieren) oder schwächen.

1.3.1.2 Antikörper: Rolle, Bedeutung und Funktionen

Wie oben bereits erwähnt wurde, gibt es verschiedene Mechanismen, durch die Antikörper Effektorfunktionen auslösen können.

Wenn ein Antigen (viralen oder bakteriellen Ursprungs) eine Immunantwort bzw. eine Antikörperbildung hervorgerufen hat, kann das Pathogen durch die Antikörper direkt am Eintritt gehindert und seine Infektiosität auf diese Weise neutralisiert werden. In diesem Fall binden die

Antikörper an Epitope, die für Aufnahme des Pathogens in die Wirtszelle essentiell sind. Danach ist das Virus nicht mehr aktiv und kann nicht mehr mit der Zelle interagieren bzw. die Zelle infizieren. Dieser Prozess heißt Neutralisation (Abb. 3).

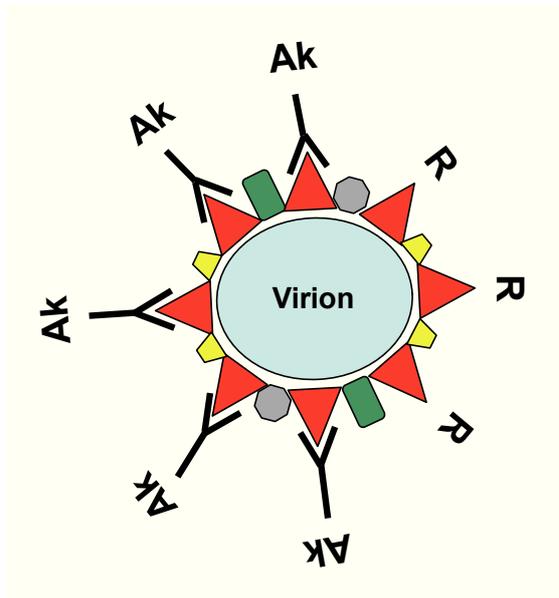


Abb. 3. Virus-neutralisierende Ak-Interaktion.

R – „Entry“ - Rezeptor (Zutrittrezeptor)

Ak – neutralisierende Antikörper

Auf der Oberfläche eines Virions werden verschiedene Proteine exprimiert. Bestimmte virale Antigene (Proteine) können als Eintrittsrezeptoren (R) wirken: Sie treten in Kontakt mit der Wirtszelle und sind für den Eintritt in die Zelle essentiell. Die neutralisierenden Antikörper (Ak) können diese Rezeptoren binden und damit die Rezeptoren blockieren/neutralisieren, was den Eintritt in die Zelle blockiert.

Neutralisierende Antikörper werden neutralisierend genannt, weil sie virale/bakterielle Proteine binden, die für das Andocken, den Eintritt oder das Entpacken des Virus essentiell sind und ihre Funktion durch die Bindung blockieren.

Wenn die Zellen aber bereits von dem Virus infiziert worden sind, beginnen die Zellen, im Zuge des viralen Lebenszykluses, an der Zelloberfläche virale Proteine zu präsentieren (z.B. die viralen Strukturkomponenten beim *budding* [Knospen] der Viren). In diesem Fall gibt es weitere Möglichkeiten für Antikörper, an infizierte Zellen zu binden und zu zerstören.

So können die Antikörper im Komplex mit den Komponenten des sog. Komplementsystems wirken. (Abb. 4)

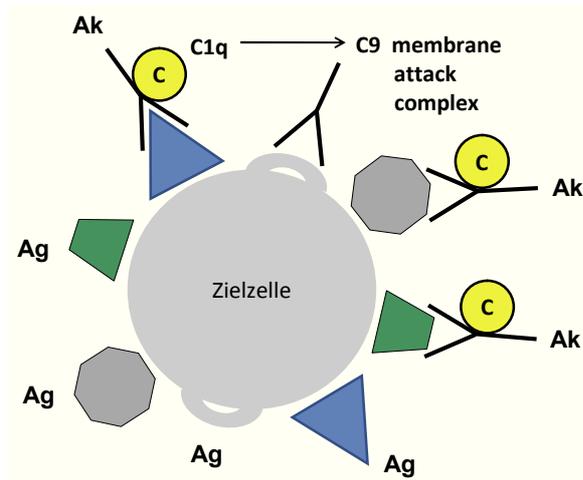


Abb. 4 Komplementabhängige Zellyse

(Quelle: http://www.medizin.uni-greifswald.de/immun/broschuere_marseille.html, mit Modifikationen)

C1q-C9 – Komponente des Komplementsystems

Ag – Virale Antigene

Ak – Antikörper

Antikörper sind in der Lage, nicht nur freie Virionen, sondern auch infizierte Zellen zu zerstören. In diesem Fall erkennen sie Antigene, die auf der Oberfläche der Zielzelle exprimiert werden und binden an diese Antigene. Mittels des „*membrane attack complex*“ des Komplementsystems, der kaskadenartig aktiviert wird und mit den Antikörpern interagiert, werden die Zielzellen lysiert.

Die Fähigkeit von Antikörpern Komplement zu aktivieren ist nicht auf IgG-Moleküle beschränkt, die während einer primären Immunantwort erst nach einiger gewissen Zeit nachzuweisen sind, sondern findet sich auch in IgM-Molekülen, die bereits in der initialen Phase einer Erstinfektion gebildet werden.

Die Antikörper rekrutieren zentrale Komponenten der Komplementkaskade. Eine Komponente rekrutiert und aktiviert die jeweils nächste Komponente bis letztendlich ein sog. Membran Attacke Komplex (*membrane attack complex*) in der Membran gebildet wird, der als eine Art Pore die Zelle lysiert (Abb. 4).

Ein weiterer antiviraler Mechanismus von IgG-Molekülen ist zellabhängig. IgG kann mit Immunzellen interagieren und diese aktivieren, so können die infizierten Zellen durch die Immunzelle lysiert werden. Zu den Zellen, die IgG-abhängig aktiviert werden, gehören insbesondere natürliche Killerzellen (NK), da NK-Zellen Rezeptoren für Antikörper, sog. Fc-Rezeptoren (siehe weiter im Kapitel „Fc γ -Rezeptoren und ADCC“), exprimieren. Neben den NK-Zellen können auch Makrophagen und dendritische Zellen auf Ihrer Oberfläche verschiedene Fc-Rezeptoren tragen. Deshalb können auch diese Zellen durch Antikörper aktiviert werden (Fanger et al., 1996; Aderem and Underhill, 1999). Es wurde gezeigt, dass die Antikörper im Prozess der

Antigenpräsentation eine wichtige Rolle spielen (Kakiuchi et al., 1983; Malynn and Wortis, 1984).

Für jede Klasse der Antikörper wurden Messmethoden erarbeitet. So basiert die Messung der neutralisierenden Antikörper auf den Kapazitäten eines untersuchten Serums eine definierte Menge von Virus *in vitro* neutralisieren zu können. Der Titer (die Serumverdünnung), bei dem 50 % des Virus neutralisiert wird, wird dann als Neutralisationstiter definiert (Quelle: World Health Organisation).

Für die Durchführung des Neutralisationstests sind relativ komplexe Laborbedingungen, wie z.B. Zellkultur und Sterilität bei der Arbeit erforderlich. Ausgehend davon wurde eine andere Antikörpermessmethode entwickelt, der sog. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Lequin, 2005). Im Unterschied zum Neutralisationstest erfordert die Methode keine Zellkulturtechniken und kann auch in üblichen Laborräumen unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden. Mittels ELISA werden alle in einem Serum vorhandenen Antikörper einer bestimmten Klasse (IgG, IgM) gemessen, die ein bestimmtes Epitop oder Pathogen binden. Der Vorteil der Methode ist die hohe Sensitivität und Spezifität. Die Antikörperfunktionalitäten (neutralisierende, zytotoxische) können in diesem Messverfahren nicht untersucht werden (siehe weiter in Kapiteln „Neutralisationstest“ und „ELISA – Anti-CMV-IgG“).

Bedeutung und Rolle verschiedener Klassen der Antikörper sowie verschiedene Fc-Rezeptoren hinsichtlich der HCMV-Pathogenese werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.3.2 HCMV und die Immunantwort: Persistenz, Reaktivierung und antivirale Immunantwort

1.3.2.1 Immunkompetente Zellen als Reservoir für latentes HCMV

Wenn man die Besonderheiten spezifischer Immunantwort für die HCMV-Infektionsabwehr beschreibt, muss man Folgendes erwähnen: HCMV kann während der akuten Infektion mittels PCR in Blut und Knochenmarkzellen quantitativ nachgewiesen werden, wobei festgestellt wurde, dass es bei gesunden, aber HCMV-seropositiven Probanden, nicht gelang, Virusgenome im Serum nachzuweisen (Wills, 2007). Einige Autoren zeigen, dass HCMV in der Latenz aber in myeloischen Zellen mit empfindlichsten PCR-Verfahren nachgewiesen werden kann (Sinclair and Sissons, 2006). Außerdem hat die Verwendung von hochempfindlichen PCR-Techniken ergeben, dass HCMV in CD14⁺-PBMZ, CD34⁺-Zellen (Mendelson et al., 1996; Taylorwiedeman et al.,

1991) und auch in CD33⁺-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden kann (Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998).

Bezüglich der CD14⁺-Zellen wurde gezeigt, dass nur wenige Monozyten HCMV-DNA enthalten (< 1 von 10⁴ Zellen) (Slobedman and Mocarski, 1999). In diesen Zellen wurde jeweils auch nur eine geringere Anzahl von Virusgenom-Kopien nachgewiesen (6-13/Zelle) (Slobedman and Mocarski, 1999), wobei das virale DNA-Genom in episomaler Form vorlag (Bolovan-Fritts et al., 1999)

CD34⁺ und CD33⁺-Zellen

Ein mögliches Zellreservoir für HCMV wurde von mehreren Autoren beschrieben und phänotypisiert (Maciejewski et al., 1992; Minton et al., 1994; Movassagh et al., 1996; Sindre et al., 1996; Goodrum et al., 2002). Die Anwesenheit von HCMV in Zellen des Blutsystems ließ vermuten, dass die universalen, CD34-positiven Blut-Vorläuferzellen als Reservoir für die latente HCMV-Infektion dienen. Tatsächlich spielen diese Zellen aber wahrscheinlich keine große Rolle für die Latenz von HCMV. Im Gegensatz zu den CD34⁺-Zellen wurden insbesondere CD33⁺-Zellen, Vorläuferzellen der Granulozyten-Makrophagen Linie, als HCMV-Reservoir nachgewiesen (Kondo et al., 1994; Kondo et al., 1996; Hahn et al., 1998). Immunzytochemische Charakterisierungen der Zellen, aus denen HCMV reaktiviert werden konnte, zeigen eine Expression von CD15 (einen Marker für Granulozyten), CD14 (einen Marker für Monozyten) und auch CD1a (Marker für dendritische Zellen) (Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998).

Das Vorhandensein von HCMV in DCs wurde auch beschrieben (Reeves et al., 2005). Außerdem wurden weitere Blutzelltypen, wie z.B. Lymphozyten und Neutrophile, als potenzielles Reservoir für HCMV diskutiert, da Neutrophile während einer aktiven HCMV-Infektion das Virus enthalten und es auch übertragen können. Bei gesunden Probanden wird HCMV in diesen Zellen jedoch nicht nachgewiesen.

Diese Befunde sind von Bedeutung im Zuge einer Bluttransfusion resp. einer Knochenmarkstransplantation, da es offensichtlich ist, dass bei einer Transplantation mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit HCMV-positive Zellen mit übertragen werden. Dieses Szenario führt zu einer ungewollten HCMV-Primärinfektion bei der Übertragung von Transplantaten von HCMV-seropositiven Donoren auf seronegative Empfänger.

1.3.2.2 Zelluläre Immunantwort bei HCMV

1.3.2.2.1 CD8⁺-Lymphozyten.

CD8⁺-Lymphozyten stellen eine große Lymphozytensubpopulation dar. Mit seiner großen Kodierungskapazität exprimiert HCMV eine Vielzahl von Proteinen, die als potentielle CD8⁺-Zellepitope dienen können. Insbesondere wurden wichtige T-Zell-Epitope in dem *immediate-early* Protein 1 (*ie1/pp72*), pp28, pp50, pp65, den Oberflächenproteine gB und gH mittels FACS- oder ELISPOT-Methoden nachgewiesen (Borysiewicz et al., 1983; Mclaughlinter et al., 1994; Wills et al., 1996; Kern et al., 2002; Elkington et al., 2003).

Bei den Proteinen, die vom Immunsystem detektiert werden, spielt das pp65-Protein eine wichtige immundominante Rolle. Experimente mit HCMV-Mutanten, die kein pp65 (*UL83*) kodieren, haben gezeigt, dass dieses Protein eine ausgeprägte immunstimulierende Aktivität hat. Zu den besonders wichtigen Proteinen für die HCMV-Erkennung durch T-Zellen gehört auch das *ie1/pp72*-Protein. Obwohl zahlreiche verschiedene Virusproteine als mögliche Kandidaten für die CD8-spezifische Antwort beschrieben wurden (Elkington et al., 2003), bleiben jedoch pp65 und *ie1* die wesentlichsten immundominanten Proteine.

Eine Bedeutung der CD8⁺-Zellen für die Abwehr von CMV-Manifestationen wurde sowohl im Tiermodell, als auch am Beispiel transplantierter Patienten gezeigt. Der Transfer CMV-spezifischer CD8⁺-Zellen im Mausmodell kann der Letalität von Mauscytomegalovirus (MCMV)-Reaktivierungen vorbeugen (Reddehase et al., 1987), und im umgekehrten Fall kann die Depletion von CD8⁺-Zellen zu einer erhöhten Letalität führen (Polic et al., 1998).

Es gibt auch eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von HCMV-spezifischen CD8⁺-Zellen und der Kontrolle der HCMV-Infektion in der Posttransplantationsphase nach allogener Stammzelltransplantation, wobei gezeigt wurde, dass das Erreichen von mehr als zehn HCMV-spezifischen CD8⁺-Zellen pro µl Blut zu einem wirksamen Schutz gegenüber HCMV führt (Cwynarski et al., 2001).

Trotz den oben beschriebenen Evidenzen, dass die CD8⁺-Zellen eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der CMV-Infektion spielen, gibt es Arbeiten, die im Mausmodell nur begrenzte Unterschiede in der Kontrolle der MCMV-Infektion zwischen CD8⁺-Zell-depletierten und normalen Kontrollmäusen zeigen (Jonjic et al., 1990). Wurden die CD8⁺-Zellen jedoch zusammen mit anderen T-Zellsubpopulationen depletiert, so wurde eine ausgeprägte Verstärkung der Virusreplikation nachgewiesen, so dass zu vermuten ist, dass MCMV durch eine koordinierte Antwort verschiedener Äste des Immunsystems kontrolliert wird, die zumindest teilweise überlappend oder gar redundant agieren können (Polic et al., 1998).

1.3.2.2.2 CD4⁺-Lymphozyten

Wie die CD8⁺-Zellen, sind auch die CD4⁺-Zellen bei der Kontrolle einer HCMV-Infektion wichtig (Rentenaar et al., 2000; Pourgheysari et al., 2008). Vor allem modulieren diese Zellen die B-Lymphozytenfunktionen (Smith et al., 2000) und induzieren zusätzlich die Sekretion von Zytokinen (z.B. IFN γ) durch CD8⁺-Lymphozyten.

Studien zeigen, dass bei gesunden, HCMV-seropositiven Probanden im Blut ca. 1-2% der gesamten CD4⁺-Lymphozyten HCMV-spezifisch sind (Waldrop et al., 1998; Rentenaar et al., 2000). Trotz der Vielzahl von möglichen Pathogenen reserviert das Immunsystem also einen so großen Prozentsatz von Immunzellen allein für die HCMV-Kontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass in etwa 60% der gesunden HCMV-Infizierten pp65-spezifische CD4⁺-Lymphozyten nachweisbar sind. Darüber hinaus produzieren CD4⁺-Zellen Zytokine, wie Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-2 (Rentenaar et al., 2000; Bitmansour et al., 2002).

Eine große Bedeutung haben CD8⁺- und CD4⁺-Lymphozyten bei transplantierten Patienten. Die Informationen über diese Zellen und ihre Rolle in der Immunantwort, die den letzten Jahren gewonnen wurden, waren so vielversprechend, dass nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in der klinischen Praxis neue diagnostische und therapeutische Methoden entwickelt wurden, die auf solche Zellen abzielen. So wurden Methoden entwickelt, die es ermöglichen, solche Zellen von Donoren zu isolieren und dem Patienten nach der erfolgten Transplantation zurück zu transfundieren („adoptive Immuntherapie“, (Rauser et al., 2004). Da die Anzahl dieser Zellen in Abwesenheit einer HCMV-Reaktivierung jedoch relativ niedrig ist, wurden Techniken erarbeitet, die es ermöglichen, diese Zellen *in vitro* zu stimulieren und sie so zur Proliferation anzuregen. Die Bedeutung von CD8⁺- und CD4⁺-Zellen wurde außerdem bei Patienten demonstriert, bei denen Virusmutanten mit einer Resistenz gegenüber herkömmlichen Virostatika während der Posttransplantationsphase auftraten. Die Transfusion von HCMV-spezifischen Lymphozyten hat in solchen Patienten zur Kontrolle von HCMVs geführt (Einsele et al., 2002).

1.3.2.2.3 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind die antikörperproduzierenden Zellen des Immunsystems. Wie in den folgenden Kapiteln weiter diskutiert wird, spielen die Antikörper bei CMV-Infektion eine wichtige Rolle (siehe Kapitel „Antikörper und CMV-Infektion“). Da diese Zellen Antikörper produzieren, kann kein Zweifel bestehen, dass eine erfolgreiche Rekonstitution dieser

Lymphozytensubpopulation resp. eine humorale Rekonstitution nach Transplantation eine wesentliche Bedeutung bei der Kontrolle einer CMV-Posttransplantationsreaktivierung hat.

Die absolute B-Zellzahl ist meistens innerhalb der ersten 100 Tage nach der erfolgten Transplantation niedriger als der Normalwert. Außerdem kann es in der früheren Posttransplantationsphase zu einer B-Zell-Aktivierungsdysfunktion, und in der späteren Posttransplantationszeit zu Problemen bei der IgG-Produktion kommen. Beides wurde insbesondere bei Patienten mit einer chronischen GvHD beschrieben (Storek and Saxon, 1992).

Bezüglich der Ig-Klassen muss erwähnt werden, dass die IgM-Konzentration 2-6 Monate nach der Stammzelltransplantation auf den Normalwert zurückkehrt (Storek and Saxon, 1992).

Die IgG-Menge zeigt jedoch keine solche Kinetik. Es wird auch kein einheitlicher Verlauf der einzelnen IgG-Subklassen gefunden. IgG1 und IgG3 erreichten bereits nach 9-12 Monaten wieder Normalwerte (Storek and Saxon, 1992). IgG2 und IgG4 bleiben noch einige Jahre nach der Transplantation auf einem niedrigeren Niveau (Noel et al., 1978; Kelsey et al., 1990), so dass geschlossen werden muss, dass die Rekonstitution der einzelnen IgG-Subtypen und der jeweiligen, produzierenden B-Zellen mit unterschiedlichen Kinetiken erfolgt.

Man könnte sich vorstellen, dass eine erfolgreiche Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten nur dann erfolgt, wenn vorher eine Rekonstitution der T-Helferzell-Subpopulation erfolgt ist, weil eine Notwendigkeit von T-Helferzellen für die Produktion von Antikörpern besteht. Neben dieser Anhängigkeit der B-Zellfunktion von dem Vorhandensein von T-Helferzellen wurde gezeigt, dass die B-Lymphozyten aber auch unabhängig von den T-Helferzellen Antikörper produzieren können (Hebeis et al., 2004).

1.3.2.2.4 NK-Zellen: Antikörperunabhängige und antikörperabhängige Mechanismen der Aktivierung

1.3.2.2.4.1 Antikörperunabhängiger Mechanismus der NK-Zellaktivierung

NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die zum angeborenen Immunsystem gehören (Caligiuri, 2008). Sie wurden vor allem als „anti-tumor“ Zellen beschrieben. Es wurden verschiedene Mechanismen gezeigt, die es NK-Zellen ermöglichen, Tumorzellen sowie infizierte oder beschädigte Zellen zu erkennen und zu zerstören. Dabei unterscheidet man antikörperabhängige und antikörperunabhängige Wege der NK-Zellaktivierung. Hinsichtlich der antikörperunabhängigen Mechanismen wurde das „missing self“ Konzept entwickelt: NK-Zellen „messen“ grundsätzlich die MHC-Präsentation von anderen Zellen und werden durch eine fehlende MHC-I-Expression (sog. *missing-self*) aktiviert (Karre, 2002; Karre, 2008). NK-Zellen

verrechnen positive Aktivierungssignale, die durch stressabhängige Liganden auf potentiellen Zielzellen hervorgerufen werden und negative Aktivierungssignale, die durch MHC-Moleküle hervorgerufen werden. Unter physiologischen Bedingungen werden auf der Oberfläche jeder Zelle MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert. Wenn NK-Zellen mit diesen Zellen in Kontakt kommen, so interagieren diese MHC-Klasse-I-Moleküle mit den inhibitorischen Rezeptoren. Es wurden zwei verschiedene Typen von diesen Rezeptoren beschrieben: KIRs (*killer immunoglobulin-like receptor*), die die klassische MHC-Klasse-Ia (HLA-A, B, C) Liganden binden und CD94-NKG2A Heterodimere, die die nichtklassische MHC-Klasse-Ib (HLA-E) Moleküle binden (Caligiuri, 2008). Die Bindung führt zur Hemmung der Aktivität der NK-Zelle und so wird die Zerstörung gesunder Selbst-Zellen verhindert. Im Falle einer bösartigen Transformation oder einer Infektion wird die Expression von MHC-I-Molekülen oft herunterreguliert, um der Kontrolle von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zu entgehen. Die KIRs erhalten dann keine hemmenden Signale mehr, was zu einem Übergewicht der Stimulation der aktivierenden Rezeptoren und zur letztendlichen Zerstörung dieser Zelle führen kann (Abb. 5). Neben den oben genannten Effekten wurden auch andere, für die Infektionsabwehr relevante Eigenschaften dieser Zellen demonstriert. In Bezug auf eine HCMV-Infektion wurde beschrieben, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der frühen Virusreplikation spielen (Bukowski et al., 1984; Tay et al., 1998; Biron et al., 1999). Während der Evolution hat HCMV jedoch Eigenschaften entwickelt, die es ihm ermöglichen, eine stimulatorische Interaktion mit NK-Zellen zu vermeiden (Übersichtsartikel: (Hengel et al., 1998).

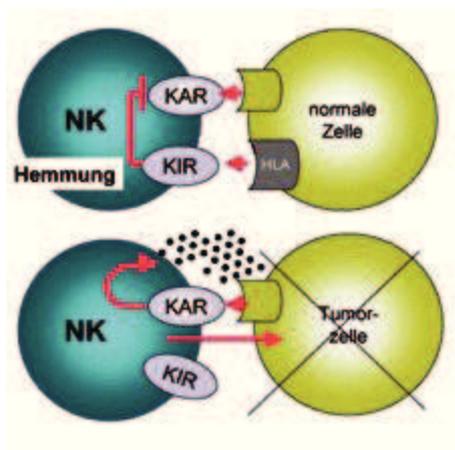


Abb. 5. Aktivatorische und inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen
 (Quelle: http://www.medizin.uni-greifswald.de/immun/broschuere_mrseille.html)
 NK-NK-Zelle; KIR – inhibitorischer Rezeptor
 KAR-aktivierender Rezeptor.
 HLA- *human leukocyte antigen complex*

Auf der Oberfläche der NK-Zellen werden inhibitorische und aktivierende Rezeptoren exprimiert. Inhibitorische Rezeptoren erkennen die auf Zelle exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle, was zur Hemmung der NK-Zellenaktivierung führt. Bei einer bösartigen Transformation oder Infektion einer eukaryontischen Zelle wird dieser Komplex geändert bzw. wird die Expression dieser Moleküle herunterreguliert, was zur Abschwächung der Erkennung des Komplexes durch den KIRs und letztendlich zur Aktivierung der NK-Zelle und Zerstörung der Zielzelle führt.

Zu den Mechanismen, durch die die NK-Zellen infizierte Zellen beeinflussen können, gehört auch ein so genannter mittelbarer Einfluss auf die IFN- β -Produktion der infizierten Zellen, welches die weitere Virusreplikation intrazellulär begrenzt (Iversen et al., 2005).

1.3.2.2.4.2 Antikörperabhängiger Mechanismus der NK-Zellaktivierung: Fc γ -Rezeptoren und ADCC

Neben den antikörperunabhängigen Mechanismen existieren zusätzliche Aktivierungsmechanismen, für die die NK-Zelle die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern benötigt. Es handelt sich um die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*). Diese immunologische Reaktion wird durch zwei Hauptkomponenten vermittelt: sog. Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) auf der Oberfläche der Immunzellen und dem Antikörper. Um diese Reaktion verstehen zu können, muss man sich der Struktur des IgG-Moleküls zuwenden.

Wie der Name der Rezeptoren impliziert, binden Fc-Rezeptoren den konstanten Teil der Antikörper, das sog. Fc-Fragment (Abb. 6). Dieser Teil ist von Antikörper zu Antikörper konstant und weist keine Variabilität auf, um zu gewährleisten, dass unterschiedliche Antikörper trotzdem von den gleichen Rezeptoren erkannt werden können. Die Abkürzung „Fc“ beruht auf dem gleichnamigen Fragment des IgG-Moleküls dem sog. *fragment cristalizabile* (dem kristallisierbaren Fragment).

Der zweite IgG-Teil ist das F(ab)₂-Fragment. Abweichend von dem konservierten Fc-Fragment ist das F(ab)₂-Fragment hypervariabel. Die Abkürzung bedeutet „*fragment antigene binding*“. Wie der Name bereits andeutet, spielt dieses Teil des Antikörpers für die Antigenerkennung eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass verschieden Antigene grundsätzlich unterschiedliche individuelle räumlich orientierte Epitop-Konformationen einnehmen. Das F(ab)₂-Fragment ist hypervariabel und durch positive und negative Selektion werden B-Zellen zur Proliferation angeregt, deren Fab-Region durch Zufall in der Lage ist, den entsprechenden Epitop-Teil des Antigens zu binden. Die Fab-Fragmente verschiedener klonotypischer B-Zellen sind deshalb unterschiedlich. (Abb. 6).

Nachdem antigenspezifische Antikörper produziert worden sind, können diese die Antigene erkennen und binden. Da NK-Zellen Fc-Rezeptoren tragen, können diese wiederum die Antikörper auf der Oberfläche des Antigens erkennen und dadurch aktiviert werden.

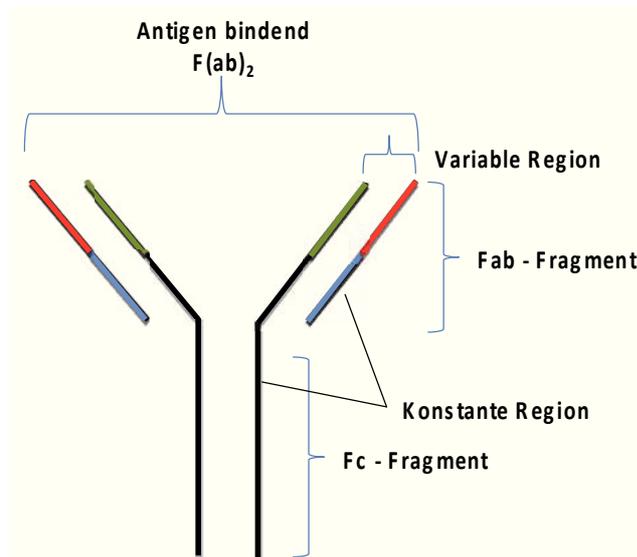


Abb. 6. Struktur des IgG-Moleküls

Ein IgG-Molekül besteht aus einem Fc-Fragment und einem F(ab)₂-Fragment. Das Fc-Fragment ist konstant und hat eine stabile, feste Struktur, die von den Art- sowie räumlichen Besonderheiten eines Antigens unabhängig ist. Das Fc-Fragment zwischen den Individuen einer biologischen Art ist gleich oder sehr ähnlich. Das Fab-Fragment hat sowohl eine konstante, als auch eine variable Region, die letztendlich für die Bindung des IgG-Moleküls an das Antigen verantwortlich sind.

Es wurde gezeigt, dass Fc-Rezeptoren als Heterodimere existieren. So wurden eine Ligandbindungs- α -Kette und zusätzliche Einheiten, wie β , γ , ζ beschrieben (Van et al., 1998). Wenn die akzessorischen Ketten in ihrem zytoplasmatischen Teil ein sog. ITAM aufweisen (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), dann wirken sie als aktivatorische Rezeptoren. Falls sie im zytoplasmatischen Teil ein sog. ITIM aufweisen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), so können sie dann immunsupprimierend wirken (Gessner et al., 1998).

Die folgenden Fc γ Rs sind beschrieben: Fc γ RI (CD64), wird auf der Oberfläche von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert (van de Winkel and Anderson, 1991; Hulett and Hogarth, 1994). CD64 bindet, als einziger Fc γ R, monomeres IgG mit hoher Affinität (Shopes et al., 1990). Hinsichtlich der verschiedenen IgG-Klassen wurde beschrieben, dass die Bindungskapazitäten von CD64 für IgG3 und IgG1 vergleichbar hoch sind, wohingegen IgG4 und IgG2 schwächer gebunden werden (Allen and Seed, 1989).

Fc γ RII (CD32), wird auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert (van de Winkel and Anderson, 1991; Hulett and Hogarth, 1994). Im Unterschied zu CD64 bindet CD32 monomeres

IgG mit niedriger Affinität, ist aber in der Lage komplexiertes IgG resp. IgG-Immunkomplexe mit hoher Affinität zu binden (Hulett and Hogarth, 1994).

FcγRIII (CD16), wird auf Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen und NK-Zellen exprimiert (van de Winkel and Anderson, 1991; Hulett and Hogarth, 1994). Wie für FcγRII, wurde auch für FcγRIII eine niedrige Affinität gegenüber monomerem IgG beschrieben (Raghavan and Bjorkman, 1996). Außer der Rolle des FcγRIII in ADCC-Prozessen wurde auch eine Beteiligung an der Phagozytose und Endozytose beschrieben (van de Winkel and Anderson, 1991; Amigorena et al., 1992; Daeron et al., 1994; Nagarajan et al., 1995). Darüber hinaus wurde die Hypothese aufgestellt, dass FcγRIII und FcγRII synergistisch wirken können und dies zur Verstärkung der Phagozytose führen kann (Edberg et al., 1992; Edberg and Kimberly, 1994).

Die Antikörper, die mit diesen Rezeptoren interagieren und so zelluläre Effektorfunktionen auslösen, werden auch als „zytotoxische Antikörper“ bezeichnet.

Obwohl die Fc-Region eines IgG-Moleküls konstant ist, werden die Antikörper durch die unterschiedlichen FcγRs (CD16, CD32 und CD64) unterschiedlich erkannt und es werden jeweils unterschiedliche Reaktionen ausgelöst. Der Kontakt der NK-Zelle mit der Fc-Region des IgG-Moleküls initialisiert eine Reaktion, die zur Sekretion bestimmter Substanzen führt (Perforine, Granzyme), durch die eine IgG-dekorierte Zelle zerstört werden kann (zytotoxischer Effekt) (Abb. 7)

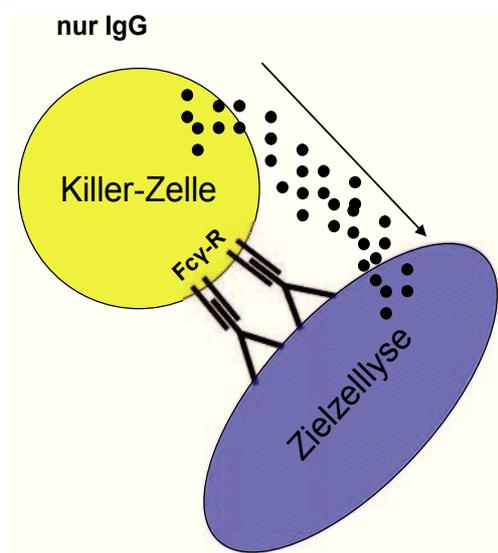


Abb. 7 ADCC-Prinzip

(Quelle: http://www.medizin.uni-greifswald.de/immun/broschuere_marseille.html, mit Modifikationen).

Spezifische IgG-Moleküle erkennen Epitope auf der Zielzelle. Mit den Fab-Fragmenten des Moleküls binden sie an die Epitope der Zelle. Danach interagieren die Fc-Fragmente des IgGs mit einem Fc-Rezeptor einer NK-Zelle, was zur Aktivierung der NK-Zelle mit der nachfolgenden

Synthese und Freisetzung spezifischer zytolytischer Substanzen wie Granzyme, Perforine führt und damit wird die Zielzelle lysiert.

Da die Hauptrolle der NK-Zellen die Erkennung und Zerstörung infizierter Zellen ist, wurden Studien unternommen, die eine Abhängigkeit der Funktionalität der NK-Zellen von der Expression der Fc γ -Rezeptoren demonstrieren. So wurde gezeigt, dass NK-Zellen auf ihrer Oberfläche geringe Mengen CD56, kein CD3 und sehr große Mengen CD16 aufweisen (CD3⁻CD56^{dim}CD16^{bright}). Diese Zellen zeigen auch die höchste zytolytische Aktivität. Die meisten transplantierten Patienten sind in der Lage diesen Zelltyp zu produzieren. Es gibt jedoch eine Gruppe von Patienten (ca. 35%), die vier Monate nach einer Transplantation eine andere Kombination der oben genannten Rezeptoren aufweist, und zwar CD56^{bright}CD16⁻ (Gottschalk et al., 1990). Diese Zellen haben eine schwächere zytolytische Aktivität, obwohl diese Aktivität jedoch nach einer Behandlung mit IL-2 verstärkt werden kann (Jacobs et al., 1992).

1.3.3 Antikörper und CMV-Infektion

1.3.3.1 Neutralisierende Antikörper

Die Bedeutung und Rolle der neutralisierenden Antikörper in der HCMV-Infektion sind bis jetzt nicht klar.

Es gibt fundierte Hinweise für die Effektivität von Antikörpern gegen MCMV im Falle der Verwendung von polyklonalen anti-MCMV-Antikörpern. Diese Antikörper können infizierte Mäuse (*Mus musculus*) vor einer letalen MCMV-Dosis schützen (Rapp et al., 1993; Shanley et al., 1981). Es wurde experimentell nachgewiesen (Jonjic et al., 1994), dass B-Zell-defiziente Mäuse mit einer latenten MCMV-Infektion nach einer zusätzlichen Immunsuppression einen 100- bis 1000-fach höheren MCMV-Virustiter als Kontrolltiere aufweisen, und dass die Transfusion von antikörperhaltigem Immenserum den B-Zell-defizienten Mäusen zur Verminderung des Virustiters verhalf. Es wurde außerdem beschrieben, dass Antikörper eine Reaktivierung nicht vermeiden können, die Infektion wurde jedoch durch die Antikörper auf das Organ, in dem die Reaktivierung anfänglich stattgefunden hatte, begrenzt (Reddehase et al., 1994). Andere Autoren haben gezeigt, dass eine Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen verschiedene Strukturproteine von MCMV gerichtet sind, zu einer signifikant niedrigeren Sterblichkeit bei der Infektion der Mäuse führte (Farrell and Shellam, 1991). Es ist aber anzumerken, dass dabei keine direkte Korrelation zwischen den *in vivo* und *in vitro*-neutralisierenden Kapazitäten dieser Antikörper festgestellt wurde: Die Autoren haben gefunden, dass die Antikörper, die *in vitro* keine neutralisierenden Kapazitäten zeigten, trotzdem protektive

Eigenschaften *in vivo* besaßen. Außerdem wurden auch organspezifische Unterschiede bei der Wirkung von Antikörpern beobachtet. So waren Antikörper in der Leber bei BALB/c und C57BL/10 Mäusen antiviral wirksam, wobei eine direkte Korrelation zwischen den *in vitro*- und *in vivo* Befunden beobachtet wurde. Dabei wurde aber auch festgestellt, dass die selben Antikörper keine Wirkung auf den MCMV-Virustiter in den Milzen von BALB/c-Mäusen hatten (Farrell and Shellam, 1991). Ein weiterer Befund zeigt, dass die Antikörper, die für ihre *in vitro*-Funktion Komplement benötigten, vergleichbar effizient bei Mäusen waren, die ein Defizit des C5-Komponents des Komplementsystems hatten. Die Befunde dieser Autoren lassen uns also schlussfolgern, dass

- 1) neutralisierende Antikörper grundsätzlich protektive Effekte *in vivo* besitzen
- 2) es aber nicht immer eine direkte Korrelation zwischen der *in vivo* und *in vitro*-Effizienz gibt
- 3) es organspezifische Besonderheiten der antiviralen Wirkung gibt
- 4) es unterschiedliche Effektormechanismen *in vivo* und *in vitro* gibt.

Abweichend von den oben beschriebenen Daten sind die Hinweise für eine entscheidende Bedeutung von neutralisierenden Antikörpern während der HCMV-Infektion nicht eindeutig. Ein potentielles Indiz, das eine Wirkung von Antikörpern hätte aufzeigen können, ist die klinische Vergabe von Immunglobulinpräparationen. Es wurde gezeigt, dass selbst 20 Jahren nach der klinischen Anwendung keine beweiskräftigen Argumente für eine Wirkung der Präparate demonstriert werden konnten (Sokos et al., 2002). Eine Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen das Glykoprotein H (gH) bei Patienten mit Stammzelltransplantation hat keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe ergeben (Boeckh et al., 2001).

Diese Disparitäten zwischen der experimentell bewiesenen Effizienz der Antikörper im Tiermodell und der Ineffizienz unter klinischen Bedingungen können möglicherweise erklärt werden: So wurde gezeigt, dass verschiedene Immunglobulinpräparationen gar keine signifikante Neutralisationswirkung gegen HCMV hatten (Schmitz and Essuman, 1986), wobei außerdem die absolute Menge von applizierten HCMV-spezifischen Antikörpern in den kommerziellen Präparationen relativ gering war und der Titer der neutralisierenden Antikörpern zwischen 1:14 und 1:43 nachgewiesen wurde, so dass erst eine Infusion von erheblichen Präparatmengen zu einer anti-HCMV-Wirkung hätte führen können (Filipovich et al., 1992). Ein wesentlicher Befund dabei ist, dass bei transplantierten Patienten mit einer HCMV-Infektion eine starke Bildung von den eigenen neutralisierenden Antikörpern (NT-Titer zwischen 1:500 und 1:2000) beobachtet wird. Der wichtigste Befund ist, dass der Antikörpertiter mit der Abwesenheit von

Virus korreliert und die Antikörper Patienten also vor einer HCMV-Infektion schützen scheinen (Schoppel et al., 1998).

Hinsichtlich der Ursachen, die eine *in vivo*-Ineffektivität der Antikörper verursachen könnten, wäre auch die immunologische Heterogenität verschiedenen HCMV-Stämmen zu nennen (Mach, 2006).

1.3.3.2 Zytotoxische Antikörper

Unter zytotoxischen Antikörpern versteht man Antikörper, die Zielzellen destruieren, z.B. über Fc γ -Aktivierung oder Komplement. Nach Bindung an das Pathogen rekrutieren sie über den Fc-Teil Effektormechanismen, so können diese Antikörper nach der erfolgreichen Bindung an Antigene auf der Oberfläche von infizierten Zellen Fc-Rezeptor-tragende Zellen wie z.B. NK-Zellen rekrutieren und aktivieren. Die zytotoxische Wirkung geht dann letztendlich von der rekrutierten Immunzelle aus. Das Vorhandensein und die Rolle von NK-Zellen für die antikörperabhängige Zytotoxizität während einer MCMV-Infektion wurden bereits beschrieben (Manischewitz and Quinnan, 1980). Im Mausmodell wurden Titer der zytotoxischen und neutralisierenden Antikörper während einer MCMV-Infektion gemessen, und es wurden deutlich höhere Titer von zytotoxischen Antikörpern im Vergleich zu neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen. Die Autoren betonen, dass NK-Zellen und antikörperabhängige Zytotoxizität bei der Kontrolle der MCMV-Infektion eine wichtige Rolle spielen.

Obwohl bekannt ist, dass die antikörperabhängige Zytotoxizität bei der Infektionskontrolle wichtig ist, ist diese Frage hinsichtlich der HCMV-Infektion noch unbeantwortet.

Wie schon erwähnt wurde, wird das ADCC-Phänomen von den Fc γ -Rezeptoren vermittelt. Es ist bekannt, dass Fc γ -Rezeptoren nicht nur auf der Oberfläche von NK-Zellen, sondern auch auf zytotoxischen Lymphozyten präsentiert werden. Es wird aber berichtet, dass diese Expression im Vergleich zu NK-Zellen schwächer ausgeprägt ist, obwohl eine Subpopulation von den T-Lymphozyten mit einer relativ hohen CD16-Expression auf der Zelloberfläche gefunden wurde und eine mögliche Beteiligung dieser Subpopulation in verschiedenen physiologischen sowie autoimmunen Prozessen unterstrichen wurde (Clemenceau et al., 2008). Trotz der Anwesenheit dieser Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche dieser CTLs spielen sie scheinbar keine entscheidende Rolle für die antikörperabhängigen Mechanismen der Immunabwehr. NK-Zellen, die die höchste Expression dieser Rezeptoren zeigen, sind für die ADCC-Funktion entscheidend. Die Bedeutung der antikörperabhängigen Zytotoxizität wurde überzeugend nachgewiesen (Clemenceau et al., 2006).

Schließlich muss man auch die folgende Arbeit über Antikörper erwähnen, in der demonstriert wurde, dass eine Transfusion von CMV-spezifischen B-Zellen in T- und B-Zelldefiziente Mäuse eine signifikante Reduktion des Virustiters verursacht hat. Wesentlich war, dass diese Effekte in der Abwesenheit von T-Zellen beobachtet wurden und unter Umständen ADCC-abhängig sind (Klenovsek et al., 2007).

Eine offensichtliche Korrelation zwischen dem Niveau der neutralisierenden Antikörper und Antikörpern, die am ADCC-Phänomen beteiligt sind, ist nicht gegeben, so dass Messungen der Gesamtmenge an IgG über ELISA und Messungen des Neutralisationstiters keine Auskunft über die Menge an vorhandenen ADCC-auslösenden IgG-Molekülen geben. Es ist wichtig hervorzuheben, dass infizierte Zellen auf ihrer Oberfläche ein anderes Repertoire an viralen Proteinen exprimieren als freie Virionen außerhalb der Zelle (Klenovsek et al., 2007). Es werden also zwei verschiedene Antikörperpopulationen angenommen: Viruspartikel-reaktive und solche, die gegen infizierte Zellen gerichtet sind. Deshalb können Divergenzen zwischen dem Neutralisationstiter (hier wirken nur Partikel-reaktive Antikörper) und dem Titer der zytotoxischen Antikörper und Disparitäten zwischen *in vitro* und *in vivo* – Effizient entstehen.

2 Ziel der Arbeit

Moderne diagnostische Methoden ermöglichen sowohl einen Virus-, als auch einen Virus-spezifischen Antikörpernachweis durchzuführen. In der Vorbereitungsphase einer PBSCT muss festgestellt werden, ob Empfänger und Spender HCMV-positiv sind. Während einer Virusreaktivierung kann das mittels PCR festgestellt und quantifiziert werden. Die Methode ist sehr sensitiv, spezifisch und ermöglicht, in manchen Fällen auch eine asymptomatische, subklinisch verlaufende Infektion nachzuweisen. Gesunde Stammzellspender haben normalerweise keine PCR-nachweisbare HCMV-Virämie.

Um den HCMV-Serostatus zu bestimmen, kann ein IgG-Antikörpernachweis mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt werden. Der ELISA bestimmt definitionsgemäß alle HCMV-spezifischen IgG-Antikörper, die ein immobilisiertes HCMV-Antigen binden können. In der Regel wird ein Zelllysate HCMV-infizierter Fibroblasten als Antigenquelle eingesetzt. Funktionelle Charakteristika der Antikörper (wie z. B. Neutralisation, zytotoxische Wirkung oder Komplementaktivierung) werden dabei nicht erfasst. Das bedeutet, dass der IgG-Titer praktisch einen Gesamtwert aller IgG-Antikörper mit CMV-Spezifität darstellt. Es gilt jedoch als gesichert, dass diese jeweiligen IgG-Effektor-Funktionen eine entscheidende Rolle in der Immunkontrolle von Viren spielen. Da HCMV nach Stammzelltransplantationen relativ häufig reaktiviert, war das Ziel der Studie, unterschiedliche Antikörperfraktionen mit unterschiedlichen immunologischen Funktionen zu untersuchen. Außerdem sollte das Verhältnis dieser Antikörper während den verschiedenen Infektionsphasen nach der Transplantation zeitlich erfasst werden. Im Mittelpunkt der Arbeit steht der Antikörpernachweis mittels eines in der Arbeitsgruppe neu entwickelten Fc γ -Rezeptoraktivierungs-Testverfahrens, das es ermöglicht, eine spezifische funktionelle Klasse von Fc γ -Rezeptor-aktivierenden Antikörpern nachzuweisen. Eine Untersuchung dieser Klasse von Antikörpern in der Virusinfektion ist bis dato noch niemals vorgenommen worden. In der aktuellen Arbeit wurde eine Antikörperfraktion für die Aktivierung des CD16-Fc γ -Rezeptors parallel mit dem klassischen ELISA-Antikörpernachweisverfahren untersucht. Exemplarisch wurden die Werte mit Neutralisationsexperimenten verglichen.

Die in der Studie erhaltenen Daten sollten zur Hypothesengenerierung bezüglich der Rolle HCMV-spezifischer, Fc γ R-aktivierender IgG-Antikörper dienen und so die Grundlage für eine anschließende prospektive Studie bilden.

2.1 Arbeitsplan

Es wurde bei den ausgewählten Patienten die folgenden Parameter untersucht:

- HCMV-Virämie (PCR-Nachweise der HCMV DNA-Genomkopien)
- Anti-HCMV-Gesamtantikörpertiter (HCMV-IgG Nachweis per ELISA);
- CD16-aktivierenden Antikörpertiter (Fc γ -Rezeptoraktivierungs-Testverfahren, BW-Assay);
- Neutralisierende Antikörper (Neutralisationstest).

Außerdem wurden klinische Informationen, wie z.B. Dauer der Virämie, GvHD (Graft-versus-Host-Disease), Behandlung (Virostatika, Immunglobulinpräparationen) gesammelt.

Wichtige Kriterien für die Patientenauswahl waren die folgenden Parameter:

- Nachweise einer HCMV-Infektion in der Anamnese;
- Nachweis einer „virämischen“ Phase nach der Transplantation;
- Das Vorhandensein einer „postvirämischen“ Phase nach der Transplantation.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien, Geräte

3.1.1 Zellkulturen

Tab. 1 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Medien, Geräte

Name	Hersteller/Firma/Land
------	-----------------------

Zellkulturflaschen

Zellkulturflaschen 175 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Zellkulturplatten

96-Vertiefung-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
-----------------------	---------------------------

Zentrifugenröhrchen

Falcon Röhrchen, 15 ml	Greiner bio-one, Deutschland
Falcon Röhrchen, 50 ml	Greiner bio-one, Deutschland
Röhrchen 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipetten , Stripetten, Spitzen

Glaspipetten 5, 10 ml	Hirschmann EM, Techcolor, Germany
Stripetten 5, 10, 25 ml	Costar, Corning, USA
Einkanalpipetten 1-10, 2-20, 50-200, 200-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipetten 10-100, 30-300 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland

Geräte

Werkbank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland HERA safe
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Mikroskop Nikon ECLIPSE TS 100	China
Neubauerzählkammer	Welabo, Düsseldorf, Deutschland
Vortexer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Einfriercontainer	Nalgene Labware, Rochester, NY, USA

Zellkulturmedien/Zusatzstoffe

D-MEM	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
RPMI	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
FCS (<i>foetal calf serum</i>)	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
Trypsin	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

3.1.2 Methodenverbrauchsmaterialien, Geräte, Software

3.1.2.1 PCR

Tab. 2 EZ 1 DNA Blood 200 µl KIT (Qiagen)

Reagenzien - Kassetten	Qiagen
Filter – Tips	Qiagen
Probenröhrchen (<i>Sample tubes</i>)	Qiagen
Elutions – Röhrchen (<i>Elution tubes</i>)	Qiagen

Verbrauchsmaterialien

<i>Optical caps (8 Caps/Strip)</i>	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
<i>Certified Rigid Thin wall skirted microplates</i>	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
<i>Certified 0,2 ml Optically Clear 8 Strip</i>	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
<i>Micro Amp splash free support base</i>	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
TipOne Filterpipettenspitze 20 µl	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
TipOne Filterpipettenspitze 200 µl	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Filterpipettenspitze 1000 µl	Starlab, Ahrensburg, Deutschland

Costar Reagent Reservoirs	Corning Incorporated, USA
PP – Test – tubes 15 ml	Greiner bio-one, Deutschland
<i>Blue Max 50 ml Polypropylene Conical Tube</i>	BD Biosciences
12 – Kanal – Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Sample tubes (2 ml)</i>	Qiagen

Testunabhängige TaqMan®-PCR-Reagenzien

<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Minimum sterile Buffer (1 mM Tris – HCl pH 8/0,01 mM EDTA)	<i>In-house</i> -Protokoll
<i>Universal – Master - Mix</i>	Applied Biosystems, Foster, CA, USA

Tab. 3 "Supermix" (Endkonzentrationen)

Komponente	Konzentration
2x TaqMan Universal Master-Mix	-
Primer R	300 nM
Primer F	300 nM
Sonde	200 nM
Uracyl-N-glycosylase (UNG)	0,5 U

Testspezifische TaqMan®-PCR – Reagenzien

Tab. 4 CMV TaqMan®-PCR (Biomers, Deutschland)

Primer, Sonde	Name	Sequenz
F-Primer	CMV-Pol-F	TCT GCA GGA CGC CGT ATT G
R-Primer	CMV-Pol-R	GCC CCG GCC TCG TAG T
Sonde	CMV-Pol-pr	<i>FAM</i> -TGCGCGATCTGTTCAACACCATTAATTTT- <i>TAMRA</i>

Tab. 5 Beta – Actin TaqMan®-PCR (Biomers, Deutschland)

Primer, Sonde	Name	Sequenz
---------------	------	---------

F-Primer	Beta-act5	TAA GTA GGC GCA CAG TAG GTC TGA A
R-Primer	Beta-act3	GAA AGT GCA AAG AAC ACG GCT AAG
Sonde	Beta actin	FAM-AGA CTC CCC ATC CCA AGA CCC CA-TAMRA

Tab. 6 Geräte, Software

Thermocycler	Applied Biosystems, Foster, CA, USA <i>TaqMan-Real-Time Thermocycler 7500</i> SDS
7500 Real Time PCR Sytem	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

3.1.2.2 IL-2 ELISA

Tab. 7 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien

Name	Hersteller/Firma/Land
------	-----------------------

Platten

Maxisorp NUNC	Danmark
---------------	---------

Antikörper

<i>Purified rat anti-mouse IL-2</i> , 0,5 mg, 1,0 ml	BD Biosciences Pharmingen
<i>Biotin rat anti-mouse IL-2</i> , 0,5 mg, 1,0 ml	BD Biosciences Pharmingen

Chemikalien/Zusatzstoffe

Tween-20	SIGMA-ALDRICH CHEMIE, GmbH, Steinheim, Deutschland
PBS. <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Dulbecco A, 100 Tablets)	OXOID LIMITED; HAMPSHIRE; ENGLAND
FCS (<i>foetal calf serum</i>)	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
Na ₂ HPO ₄ (<i>di-Natriumhydrogenphosphat</i>)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Citric acid</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>TMB</i> (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE, GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Peroxidase-conjugated Streptavidin</i>	Jackson ImmunoResearch Laboratories,

	INC., USA
Schwefelsäure	Karl Roth, GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxyd (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

3.1.2.3 AEC-Färbung

Tab. 8 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien

Name	Hersteller/Firma/Land
------	-----------------------

Antikörper

<i>Monoclonal Mouse Anticytomegalovirus Clones CCH2+DDG9</i> , 1,0 ml	Dako, Glostrup, Denmark
<i>Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i> , 2,0 ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., USA

Chemikalien/Zusatzstoffe

Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
PBS. <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Dulbecco A, 100 Tablets)	OXOID LIMITED, HAMPSHIRE, ENGLAND
Wasserstoffperoxyd (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
Milchpulver	
3-amino-9-ethyl-carbazole (Tabletten)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE, GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylformamide	SIGMA-ALDRICH CHEMIE, GmbH, Steinheim, Deutschland

3.1.2.4 ELISA

Tab. 9 Enzygnost anti-CMV/IgG-Kit

Enzygnost Anti-CMV/IgG (Testplatte, beschichtet mit inaktivierten CMV-Antigenen aus humanen Fibroblasten)	Dade Behring, Marburg, Deutschland
---	------------------------------------

Anti-Human-IgG/POD-Konjugat (vom Kaninchen)	Dade Behring, Marburg, Deutschland
Anti-CMV-Referenz P/N (human IgG)	Dade Behring, Marburg, Deutschland
Proben-Puffer POD (Tris-Puffer)	Dade Behring, Marburg, Deutschland
Konjugat-Puffer Microbiol. (Phosphat-Puffer)	Dade Behring, Marburg, Deutschland

Geräte

Behring ELISA Processor III	Marburg, Deutschland
-----------------------------	----------------------

3.1.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Tab. 10 BD Multitest IMK-Kit

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4-Reagenz in 1 ml gepufferter Kochsalzlösung mit 0,1% Natriumazid	BD Biosciences
BD Multitest CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19-Reagenz in 1 ml gepufferter Kochsalzlösung mit 0,1% Natriumazid	BD Biosciences
BD Multitest IMK – Kit Lysing Solution, 10-fach konzentriert, eine firmeneigene, gepufferte Lösung, die <15% Formaldehyd und <50%Diethylenglykol enthält	BD Biosciences

Geräte

Symex KX-21 N	Deutschland GmbH
FACS Calibur	BD Biosciences

Software

MultiSet™	BD Biosciences
-----------	----------------

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen und Patientenmaterial

3.2.1.1 Zellkultivierung

Für alle Experimente wurden folgende Zellen verwendet.

MRC-5 Zellen

Diese Art von Zellen (ATTC CCL-171) wurde in allen Experimenten als Zielzellen verwendet. Es handelte sich um embryonale humane Lungenfibroblasten, die zu den adhären Zellen gehören. Beim Mikroskopieren haben die Zellen eine längliche Form mit einem gut erkennbaren Kern. Zwischen den Zellen einer dichten Kultur kann man homogene interzelluläre Zwischenräume beobachten. Als Zellkulturmedium für diese Zellen wurden D-MEM mit zugesetzten 10% fötalem Kälberserum (*foetal calf serum*) und Penizillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet (Reagenzien, Medien und Zusatzstoffe siehe in der Tab. 1). Die Zellen wurden normalerweise 1:2 bis 1:5 gesplittet. Höhere Relationen wurden nicht durchgeführt, da die wachsenden Zellen sonst keine guten Zellkontakte untereinander hatten, was zu einer Inhibition des Wachstums und zum Sterben der Zellen führen konnte. Vor dem Zellsplitten wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Nur die Zellen, die dicht genug waren (nicht weniger als 70-80 % der Fläche der Zellkulturflasche) und keine nachweisbare Strukturdefekte hatten, wurden verwendet. Die Zellen, die Strukturdefekte hatten (Apoptose, alte Zellen), wurden verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen, dann mit 3-5 ml 1:5 verdünnten Trypsin kurz behandelt und nach dem Absaugen des Trypsins 3 – 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen leicht ablösbar waren, wurden sie in 10 ml D-MEM resuspendiert. Danach wurden die Zellen in eine neue Flasche umgesetzt oder auf Zellkulturplatten ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden jeden Tag mikroskopisch untersucht. Das Medium wurde bei Bedarf gewechselt. Das Zeichen der Notwendigkeit des Mediumersatzes war ein Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators. In diesem Fall wurde das Medium entweder gewechselt oder frisches Medium addiert.

BW-Transfektanten.

Die BW 5147 (ATTC TIB47) sind eine Suspensionszelllinie (Mausthymomzellen), die mit den entsprechenden chimären Fcγ-Rezeptor DNA-Konstrukten (CD16, -32, -64) transfiziert worden sind (Corrales-Aguilar, 2008). Als Medium wurde RPMI mit Zusatz von 10% FKS und Penizillin (100 Einheiten/ml) /Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Die Zellen wurden normalerweise in 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflasche expandiert. Sie wurden jeden Tag mikroskopisch untersucht und alle 2-3 Tage umgesetzt. Mikroskopisch hatten die Zellen eine abgerundete Form,

mit entweder klarem oder unscharf begrenztem Kern. Die Zellgröße hat variiert. Wegen der guten Wachstumskapazität der Zellen wurden sie relativ lange in Kultur behalten (bis zu einem Monat). Länger wurden die Zellen nicht verwendet, weil die Fc γ -Rezeptorexpressionskapazität über die Zeit schwächer wurde (unpublizierter Befund der Arbeitsgruppe). Als Orientierungspunkt für den Mediumwechsel wurden das Verfärben des Mediums oder eine leichte Eintrübung des Mediums wegen der Zellenvermehrung herangezogen. Die Zellen wurden resuspendiert, und dann 1:3 – 1:5 in eine neue Flasche umgesetzt.

3.2.1.2 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Vor der Zellzählung wurde das alte Medium aus der Flasche abgesaugt, die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und mit dem 1:5 verdünnten Trypsin abtrypsiniert. Nach der kurzen (3 – 5 min) Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und 1 ml der Suspension wurde in ein „Falcon“-Röhrchen überführt. Dazu wurde 3 ml frisches Medium zugegeben. Das Deckglas der Zählkammer und das Glas für die Zellmischung wurden mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet. 10 μ l der Zellsuspension und 10 μ l Trypanblau wurden gemischt, um die tote Zellen anzufärben. Das Deckglas wurde an die Kammer angepasst, so dass Newtonringe zu sehen waren. 10 μ l der Zellsuspension (mit Trypanblau) wurden unter das Deckglas pipettiert und nach 1 min wurden die Zellen gezählt. Die Zellen, die eindeutig blau gefärbt waren (tote Zellen), wurden nicht berücksichtigt. Es wurden vier großen Quadraten ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit 2 multipliziert (10 μ l Zellsuspension + 10 μ l Trypanblau). Der Wert hat die Zellzahl $\times 10^4$ je ml Ausgangssuspension angegeben.

3.2.1.3 Cryokonservieren von Zellen

Grundsätzlich wurden nur Zellen eingefroren, die eine für Gesundheit sprechende Morphologie zeigten. Die Zellen wurden wie in dem Kapitel 3.2.1.1 behandelt. Wenn nötig (adhärente Zellen), wurden die Zellen abtrypsiniert und anschließend in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde für 5 min bei Raumtemperatur und 184 g zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde die Einfrierlösung (90% FKS mit 10 % DMSO jeweils (v/v)) vorbereitet. Danach wurde der Überstand der Zellen dekantiert, die Zellen in der Einfrierlösung resuspendiert und in die Einfrieröhrchen ausgehend von 1 ml der Einfrierlösung pro Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden dann in einem Einfriercontainer platziert

und 24 h bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen aus dem Einfriercontainer in flüssigen Stickstoff (-180°) überführt.

3.2.1.4 Auftauen von Zellen

Die Einfrierröhrchen mit den Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und zügig in einem warmen Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sobald die Zellsuspension flüssig wurde, wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt, es wurden 5 – 10 ml vorgewärmtes (37° C) Medium zugesetzt und die Zellen wurden bei Raumtemperatur, 184 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach dekantiert und verworfen, die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C bis zum nächsten Tag inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und bei Bedarf wurde das Medium gewechselt (im Falle von MRC-5-Zellen) oder die Zellen wurden umgesetzt (im Falle der BW-Zellen).

3.2.1.5 Serenvorbereitung

Röhrchen mit Vollblut wurden zwischen 1562 und 1885 g bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Die Serumröhrchen wurden beschriftet. Nach 10 min wurde das Serum mit einer Pasteurpipette entnommen, ohne Zellen am Boden des Röhrchens mitaufzunehmen, anschließend wurde das Serum bei -20°C eingefroren. Für BW-Assays sowie für den Neutralisationstest wurde das Komplement durch eine 30-minütige Inkubation bei 56°C Hitze-inaktiviert. Kontrollen (Cytotect®, ein HCMV-negatives Serum) wurden derselben Prozedur unterzogen.

3.2.2 Nachweisverfahren

3.2.2.1 Nachweis der HCMV-Virämie

3.2.2.1.1 PCR (*Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction*)

Die PCR wurde durch MTAs der diagnostischen Abteilung des Institutes für Virologie, HHU durchgeführt (Komponenten für die PCR-Analyse siehe in den Tab. 2-6).

3.2.2.1.1.1 Das Prinzip des Nachweises

Das Ziel der PCR-Analyse im Fall einer Infektionserkrankung ist, das Vorhandensein des Erregers in einer biologischen Probe nachweisen zu können. Das Prinzip der Methode basiert auf den Nachweis einer zum Erreger gehörenden Nukleinsäure (DNA oder RNA). Um die „fremden“ DNA-Moleküle nachzuweisen, werden in die Reaktion 2 Primer eingesetzt. Die Primer enthalten Nukleotidensequenzen, die zu einer DNA-Region des Erregers komplementär sind. Wenn die gesuchte DNA-Sequenz bzw. der gesuchte Erreger in der Probe vorhanden sind, so werden die Primer mit der komplementären Sequenz hybridisiert und das dadurch umschlossene Genabschnitt durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt (amplifiziert). Dann werden die amplifizierten DNA-Kopien entweder durch eine Gel-Elektrophorese (qualitative PCR) oder durch RT-PCR (*real time PCR*, quantitative PCR) nachgewiesen und bzw. quantifiziert.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen PCRs wurden mittels RT-PCR (*Real-time PCR*) durchgeführt, was eine Quantifizierung der nachgewiesenen DNA-Kopien ermöglichte und somit die Schwere der HCMV-Virämie sowie ihre Dynamik über die Zeit verglichen werden konnte.

3.2.2.1.1.2 Durchführung des Nachweisverfahrens

Das Blut wurde den Studienpatienten sowie den Probanden der Kontrollgruppe in ein mit EDTA behandeltes Röhrchen abgenommen. 200 µl Probe wurden in 2 ml Probenröhrchen pipettiert und auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden dann in einem automatischen Nukleinsäureextraktor binnen 15 min eluiert. Die DNA-Extraktion erfolgte dabei über die Bindung der viralen Nukleinsäure an silicabeschichtete Magnetpartikel. Danach wurden 5 µl der eluierten Patientenprobe und der Kontrollen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 45 µl Supermix (Tab. 3) zugegeben. Die Amplifikation erfolgte dann im Thermocycler 7500 (Applied Biosystems) über ca. 1h 40 min.

Da im Fall der Bestimmung der HCMV-Genomkopien die DNA aus der Leukozytenfraktion des Blutes extrahiert wurde, war es wichtig zu wissen, aus wie vielen Leukozyten die nachgewiesene Zahl der Virusgenomkopien stammte. Dazu wurde die virale DNA-Menge mit dem Haushaltsgen β -Actin verglichen. Das β -Actin wurde über eine gleichzeitige, parallel ausgeführte TaqMan® PCR quantifiziert. Jeder absoluter Wert der Genomkopien, der bei der Messung erhalten wurde, wurde auf den β -Actin-Wert bezogen und mittels der folgenden Formeln in Kopien pro µg DNA berechnet.

1. Berechnung des DNA-Gehalts einer Probe:

333 Kopien beta – actin entspricht 1 ng DNA

D.h 1 ng DNA = Beta-actin-Kopien/333

2. Berechnung der Kopien/ μ g DNA:

$K/\mu\text{g DNA} = (\text{Spezifische Kopien/ng DNA}) \times 1000$

Außerdem wurden in jedem Test auch Standards mit dem gleichen Protokoll mitgeführt. Die Standards enthalten Virusplasmide mit einer Gesamtkopienzahl 5000, 500 und 50 Kopien. Mit der Software des Herstellers ist es möglich, anhand der mit diesen Standards berechneten Standardkurve die untersuchten Proben zu quantifizieren.

3.2.2.2 Antikörpernachweisverfahren

3.2.2.2.1 Nachweis CD16-aktivierender Antikörper

Die Methode wurde im Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität erarbeitet und etabliert.

3.2.2.2.1.1 Das Prinzip des Nachweises

Die Methode ermöglicht es CD16-aktivierende Antikörper nachzuweisen und deren Konzentration in komplexen Lösungen (wie z.B. dem humanen Serum) zu quantifizieren. (Abb. 8; Quelle: (Corrales-Aguilar, 2008, mit Modifikationen).

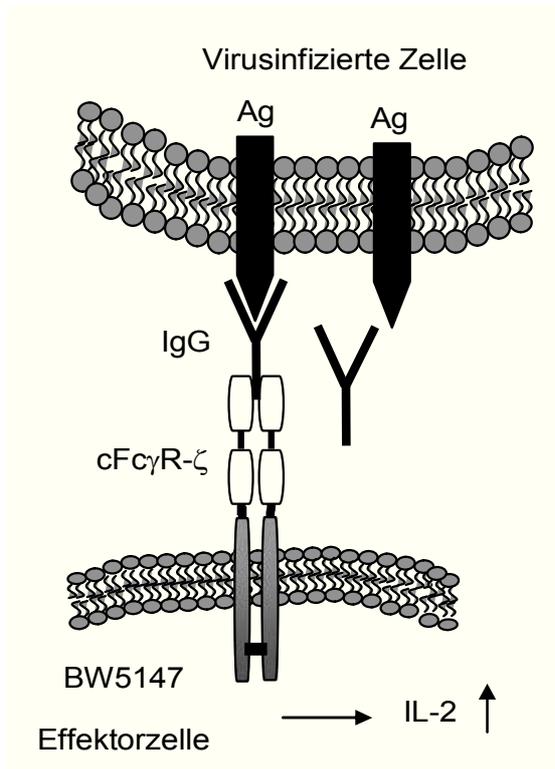


Abb. 8 Fc γ -Rezeptoraktivierungs-Testverfahren (BW-Assay)

Ag – Virusantigen

IgG – Immunglobulin G

cFc γ -R – Zellulärer Fc γ -Rezeptor

Eine virusinfizierte Zielzelle exprimiert auf ihrer Oberfläche virale Antigene (Ag). Bei der Inkubation eines Serums, das spezifische Ak (IgG) enthält, die diese exprimierten Antigene erkennen können, werden die Ak durch die Ag gebunden. Mit der weiteren Kokultivierung mit den BW5147-Effektorzellen (BW-Zellen) interagieren die Fc-Teile der IgGs mit den auf den BW-Zellen exprimierten cFc γ -Rezeptoren. Die gebildete „Brücke“ löst in den BW-Zellen biochemische Reaktionen aus und führt zu einer IL-2-Produktion. Das IL-2 kann danach per ELISA quantifiziert werden.

Das Modell reflektiert den physiologischen Prozess der Antikörper-NK-Zellinteraktion. HCMV-permissive Zellen werden infiziert, wodurch sie bestimmte virale Antigene (Ag) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Antigene können durch Antikörper, in diesem Fall IgG-Ak, gebunden werden. In der Phase der Inkubation mit den BW-Effektorzellen, interagieren die Fc-Fragmente von den gebundenen Antikörpern mit dem chimären Fc γ -Rezeptor (cFc γ R) auf der BW-Zelle, was zur Aktivierung einer biochemischen Reaktionskaskade und letztendlich einer IL-2-Produktion führt. Der chimäre Rezeptor verbindet dabei die extrazellulären Ak-Bindungseigenschaften des zellulären Fc γ -Rezeptors mit einem intrazellulären Signalmodul (zeta-Kette) aus der T-Zellrezeptorsignaltransduktion. Es wurden BW-Thymomzellen verwendet, da diese selbst keinen funktionellen endogenen T-Zellrezeptor exprimieren. Das IL-2 kann

danach per IL-2 ELISA gemessen werden. Dabei ist davon auszugehen, dass es eine direkte positive Korrelation zwischen der Menge der zytotoxischen Antikörper bzw. zwischen aktivierten Rezeptoren auf den BW-Zellen und dem produzierten IL-2 gibt.

3.2.2.2.1.2 Durchführung des Fc γ -Rezeptoraktivierungstestverfahren (BW-Assay)

Für das Testverfahren wurden MRC-5-Zellen, Passage 8-12, als Zielzellen verwendet. Eine konfluente Flasche MRC-5-Zellen wurde genommen, die Zellen abtrypsiniert und auf eine Zellkulturplatte (96-Vertiefungen) ausgesät, so dass die Zelldichte am nächsten Tag nicht weniger als 80% (der Fläche) betrug. Am nächsten Tag wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Wenn die Zelldichte weniger als 80% betrug, wurden die Zellen einen weiteren Tag inkubiert. Gleichzeitig wurden die BW-Zellen passagiert. Sobald die MRC-5 Zellen eine für die Infektion passende Dichte hatten, wurden sie mit einem HCMV-Laborstamm infiziert. Für die Experimente wurde der AD169 HCMV-Stamm verwendet. Die Virusinfektionsdosis wurde auf 2 MOI (*multiplicity of infection*, Vielfachheit der Infektion, Anzahl der potentiell PFU-bildenden Viren je Zelle) festgelegt. 2/3 jeder 96-Vertiefungshplatte wurden infiziert, was eine 4-fache Bestimmung für jede Probe ermöglichte. 1/3 jeder Platte wurde nicht infiziert (Mock-Zellen) und ermöglichte, eine Doppelbestimmung für jede Probe als Kontrolle. Die Platten wurden danach bei Raumtemperatur, 738 g zweimal für 15 min zentrifugiert (*centrifugal enhancement* der HCMV-Infektion, (Osborn, 1968)) und 3 Tage (72 h, ca. ein Infektionszyklus) im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wurden Seren in D-MEM Medium verdünnt und es wurde eine Verdünnungsreihe für jedes Serum angelegt. Die Serumverdünnung wurde in einer 96-Vertiefungszellkulturplatte angelegt (Verdünnungsplatte). Die Startverdünnung war für alle Seren gleich. Die Verdünnungsstufen (jeweils sequentiell 1:2 oder 1:3) hingen davon ab, wie hoch die Konzentration an Fc γ -Rezeptoraktivierenden Antikörpern in einem Vorexperiment war (siehe unten im „Vortest“). Die Zahl der Verdünnungsstufen für ein Serum betrug 4 bis 7. Das alte Medium wurde von der Platte mit den MRC-5-Zellen abgesaugt, die verdünnten Seren wurden entsprechend der Reihen aus der Verdünnungsplatte auf die Zellkulturplatte übertragen und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die BW-Zellen vorbereitet; die Zellen wurden resuspendiert und gezählt, so dass die Zahl der Zellen je Vertiefung $2 \cdot 10^5$ betrug. Die notwendige Menge der Zellsuspension wurde aus der Flasche entnommen, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur, 266 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden in frischem RPMI (ausgehend von 100 μ l Zellsuspension/Vertiefung) resuspendiert.

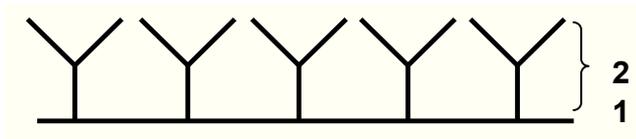
Nach der Inkubation der Zielzellen mit den Seren wurden die Seren abgesaugt und mit 100 µl/Vertiefung D-MEM dreimal vorsichtig gewaschen, um ein mögliches Abwaschen der Zellen zu vermeiden. 100 µl der BW-Zellsuspension wurden in die Vertiefungen pipettiert und die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am selben Tag wurden ELISA-Platten für den IL-2-ELISA vorbereitet (Tab. 7; die Durchführung des ELISAs siehe im nächsten Kapitel). Primäre Antikörper wurden ausgehend von 10 µl pro Platte in 5 ml Bindungspuffer verdünnt (1:500 [v/v]) und 50 µl in jede Vertiefung pipettiert (Abb. 9, Phase 1). Die Platten wurden in Folie eingeschlagen, um eine Verdunstung zu vermeiden, und bis zum nächsten Tag bei 4°C inkubiert.

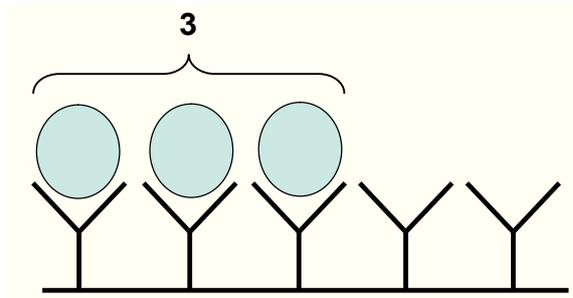
3.2.2.2.1.3 IL-2 ELISA („Sandwich“ ELISA)

Der primäre Antikörper wurde aus den (am vorherigen Tag vorbereiteten) ELISA-Platten entfernt, die Platten wurden mit 100 µl Blockierungspuffer je Vertiefung blockiert und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. 20 min vor dem Ende der Blockierungsprozedur wurden 100 µl Probenpuffer je Vertiefung auf die Platten mit den BW-Zellen pipettiert (BW-Zellyse). Nach der Blockierung wurden die ELISA-Platten dreimal mit 100 µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen und die Platte abgeklopft. Von jeder Vertiefung der Zellkulturplatte wurden 100 µl Überstand entnommen und in die entsprechenden Vertiefungen der ELISA-Platte mit einer Multikanalpipette übertragen. Es wurde zusätzlich eine IL-2-Verdünnungsreihe (0 – 500 pg/ml IL-2, 50 µl je Vertiefung, Doppeltbestimmung) vorbereitet. Alle Proben wurden danach bei 4°C über Nacht inkubiert.

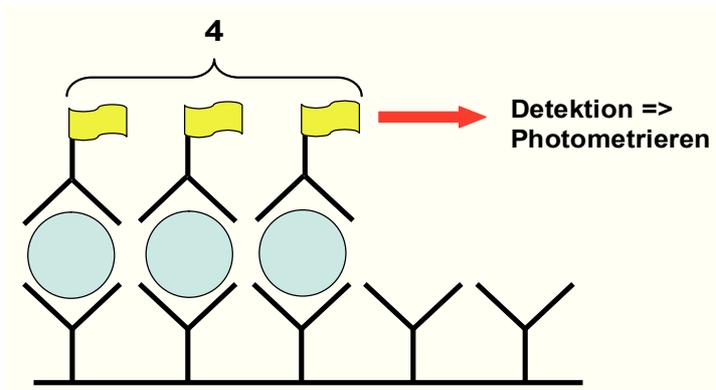
Am nächsten Tag wurden die Überstände verworfen, die Platten wurden 3x mit 100 µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen und abgeklopft. In jede Vertiefung wurden 50 µl (1:500 [v/v]) des sekundären Antikörpers pipettiert und 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. In jede Vertiefung wurde 50 µl (1:1000 [v/v]) Streptavidin-POD pipettiert, die Proben wurden exakt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Platten wurden 3-4-mal gewaschen. In jede Vertiefung wurde 50 µl der Substratlösung pipettiert, die Blau-Verfärbung verfolgt und nach exakt 4 min wurde die Reaktion mit 50 µl/Vertiefung Stopplösung (H₂SO₄, 1M) beendet. Die gelbe Farbe wurde bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm photometriert.



Phase 1: Koppelung der Platte mit den primären Antikörpern



Phase 2: Inkubation mit einem Überstand mit einem voraussichtlichen Detektionsstoff (IL-2)



Phase 3: Inkubation des Komplexes mit den sekundären detektierenden Antikörpern

Abb. 9 „Sandwich“ ELISA-Prinzip (Schema)

- 1 – ELISA-Platte
- 2 – Primäre Antikörper
- 3 – Detektierter Stoff (IL-2)
- 4 – Sekundäre Antikörper

In der ersten Phase werden primäre Ak (2) an eine ELISA-Plastikplatte (1) gekoppelt. In der zweiten Phase wird eine Probe mit den gekoppelten Ak inkubiert. Falls in der Probe die entsprechenden Stoffe (3) vorhanden sind, binden sie an die primäre Ak und können in der dritten Phase durch mit einem Farbstoff markierten sekundären Ak (4) detektiert werden.

3.2.2.2.1.4 Auswertung.

Um verschiedene Seren zu vergleichen, wurde für dieses Testverfahren ein Signifikanzkriterium der sog. „cut off“ definiert. Alle Seren wurden so weit verdünnt, dass sie am Ende einen Messwert erreichen, bei dem das Serum keinen positiven Wert (über dem *cut-off*) mehr ergab. Da in jedem Experiment die Mock-infizierten Zellen und ein negatives Serum als Kontrolle mit

untersucht wurden, konnte über diese Werte der *cut-off* ermittelt werden. Sobald ein Testserum in einer Verdünnung diesen Schnittpunkt erreicht hatte, wurde diese letzte Verdünnung als gesuchter (gerade noch positiver) Wert angenommen. Da es sich um eine IL-2-Messung handelte, wurde dabei eine IL-2-Standardkurve durchgeführt. Anhand dieser wurden die Verdünnungen mit der IL-2-Menge verrechnet und so die Seren verglichen.

3.2.2.2.2 Neutralisationstest

3.2.2.2.1 Das Prinzip des Nachweises

Um einen Titer von neutralisierenden Antikörpern für ein Serum zu bestimmen, wurde eine Konzentration resp. eine Verdünnung bestimmt, die gerade ausreicht, um 50 % der bekannten Virusmenge zu neutralisieren. Diese Serumverdünnung (angegeben als 1/x) gibt somit den Neutralisationstiter an.

3.2.2.2.2 Durchführung des Tests

Eine Flasche mit MRC-5-Zellen, Passage 8-12, wurde abtrypsiniert und die Zellen wurden in einer 96-Vertiefungenzellkulturplatte ausgesät, so dass die Zellkonfluenz am nächsten Tag ungefähr 70 – 75 % betrug. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mikroskopisch überprüft. Sobald die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurde der Neutralisationstest durchgeführt. Die Testseren wurden in einer Zellkulturplatte verdünnt. Üblicherweise wurden bis 6-7 sequentielle Verdünnungen mit 1:2 Verdünnungsstufen durchgeführt. Für jedes Serum wurde eine 3-fache Bestimmung gemacht (n=3). Die Seren wurden in die erste Reihe der Verdünnungsplatte pipettiert, so dass in jeder Vertiefung 100 µl verdünnten Serums vorlagen. In alle restlichen Vertiefungen wurden 50 µl je Vertiefung D-MEM Medium pipettiert. Die Seren wurden anschließend verdünnt. Dabei wurden die Spitzen nach jedem Schritt gewechselt. Aus der letzten Reihe wurde 50 µl Serumverdünnung/Vertiefung entnommen und verworfen, so dass letztendlich in jeder Vertiefung 50 µl verdünnten Serums vorlagen.

Die HCMV Infektion erfolgte mit dem AD169 HCMV-Stamm. Um eine zählbare Anzahl von Plaques je Zellkulturgefäß zu erhalten, wurde ein Volumen einer titrierten Virussuspension so verdünnt, dass theoretisch 50 PFU in 50 µl D-MEM vorlagen. Die experimentell bestimmten PFU/Vertiefung lagen zwischen 20 und 120. 50 µl der Virusverdünnung wurden in jede Vertiefung der Platte zusammen mit den verdünnten Seren pipettiert und die Mischung wurde 60-

80 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das alte Medium aus der Zellkulturplatte mit MRC-5 Zellen abgesaugt und die Virus-Serummischung wurde mit einer Mehrkanalpipette in die Zellkulturplatte überführt. Für eine Viruskontrolle wurden in 3 Vertiefungen jeweils 50 µl der Virussuspension ohne Serum pipettiert. Die Platten wurden bei Raumtemperatur, 738 g, zweimal für 15 min zentrifugiert und 2-3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2.2.3 AEC – Färbung

Die AEC-Färbung ermöglicht es (mit Hilfe von HCMV-spezifischen Antikörpern) HCMV-infizierten Zellen nachzuweisen. Virale Proteine, die während des HCMV-Infektionszyklus produziert werden, können mittels Antikörper nachgewiesen werden. Durch eine chemische Reaktion werden dann die Zellen, die diese Proteine enthalten, gefärbt und können beim Mikroskopieren erkannt und gezählt werden (Tab. 8).

Die mit HCMV-infizierten Zellen (siehe „Neutralisationstest“) wurden nach 3 Tagen mit kaltem Methanol (-20°C) fixiert: Das Medium wurde abgesaugt, 100 µl Methanol wurde in jede Vertiefung pipettiert und die Platten wurden bei -20°C mindestens 2 h gelagert. Danach wurde das Methanol entfernt, die Platten abgeklopft und eine Weile (10-15 min) trocknen gelassen (Abzug, unter einer Bank). Der primäre Antikörper wurde 1:100 in 1% (w/v) Milchpulver/PBS verdünnt. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie mit 100 µl PBS/Vertiefung 2-3-mal gewaschen. In jede Vertiefung wurden 50 µl des verdünnten Antikörpers pipettiert und die Platten für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Antikörper entfernt und der Waschschrift wiederholt. Sekundäre Antikörper wurden in 1/200 in 1% (w/v) Milchpulver/PBS verdünnt und jeweils 50 µl/Vertiefung zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit 100 µl PBS/Vertiefung 2-3mal gewaschen. Eine Tablette 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) wurde in 4 ml N-N-Dimethylformamide gelöst, 16 ml Acetatpuffer zugegeben und die Lösung anschließend gemischt. Dazu wurde 10 µl H₂O₂ auf 5 ml Substratlösung zugegeben. In jede Vertiefung wurden 50 µl des Substrats pipettiert und mindestens 20-30 min im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Färbung mikroskopisch verfolgt. Sobald alle infizierten Zellen gut gefärbt waren, wurde das Substrat entfernt, die Platten wurden mit 100 µl PBS/Vertiefung gewaschen und in jeder Vertiefung wurde 100 µl PBS belassen. Die Platten wurden danach bei 4°C gelagert.

3.2.2.2.4 Auswertung

Gefärbte Zellen (Foci) wurden mikroskopisch gezählt und mit der Zahl der Kontrollreihe (ohne Serum) verglichen. Die Kontrollreihe (ohne anti-HCMV Serum) wurde als 100% gesetzt. Die Serumverdünnung, bei der die Zahl der Virusfoci 50 % im Vergleich zur Kontrollreihe betrug, wurde als Neutralisationstiter angenommen und als 1/x angegeben.

3.2.2.2.3 ELISA – Anti CMV-IgG (Enzygnost, DADE Behring)

3.2.2.2.3.1 Das Prinzip des Nachweises

Wie oben bereits erwähnt wurde, ist der ELISA eine routinemäßig durchgeführte Diagnostik-Methode und wird zurzeit als „Goldstandard“ des diagnostischen Antikörpernachweises angesehen (Abb. 10).

Um HCMV-spezifische Antikörper im Blut einer Person nachweisen zu können, wird ein Lysat HCMV-infizierter Fibroblasten auf eine Platte gekoppelt. Probeseren werden dann mit dieser Platte inkubiert, und falls spezifische Antikörper im Blut vorhanden sind, binden diese an die gekoppelten Virusproteine. Da die Antikörper die Antigene über das Fab-Fragment binden, bleiben die Fc-Fragmente der Antikörper frei. Mit einem sekundären, anti-humanen IgG-Antiserum, welches diese Fc-Teile bindet, können die Fc-Fragmente bzw. die verbundenen Antikörper detektiert und das Signale photometrisch gemessen werden.

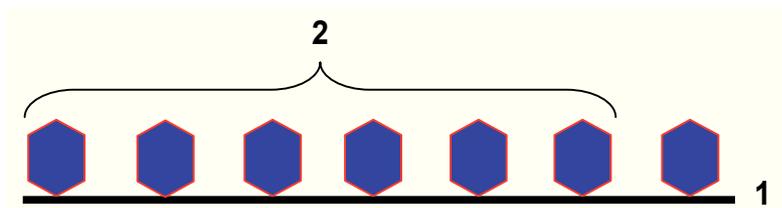
3.2.2.2.3.2 Durchführung des Nachweisverfahrens

Für die Messung wurden ELISA-Kits von Dade Behring verwendet (Tab. 9). Die ELISA-Platte besteht aus einzelnen Reihen. Die für eine Messung vorbereiteten Seren wurden auf eine Plastikplatte pipettiert (5 µl). Dazu wurden 100 µl des Proben-Puffers zugegeben. In die Vertiefungen der ELISA-Platte aus einem Kit wurden 200 µl Proben-Puffer/Vertiefung pipettiert. Die Plastikplatte mit den verdünnten Seren wurde gemischt. Danach wurden 20 µl/Vertiefungen aus der Plastikplatte in die entsprechenden, mit dem Virus gekoppelten Vertiefungen und in die Kontrollreihen der ELISA-Platte pipettiert.

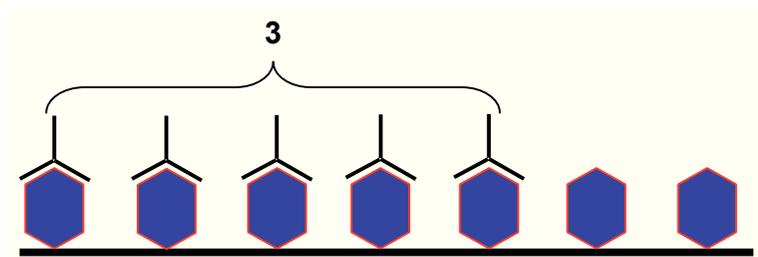
*Die Platten wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre für 60 min inkubiert. Danach wurden alle Vertiefungen abgesaugt und viermal mit verdünnter Waschlösung gewaschen. Anti-Human-IgG/POD-Konjugat wurde 1:50 in Konjugat-Puffer verdünnt. 250 µl Anti-Human-IgG/POD-Konjugat wurde in 12,5 ml Konjugat-Puffer verdünnt, 100 µl/Vertiefung pipettiert und bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Platten nach

dem oben beschriebenen Protokoll erneut gewaschen. 1 ml Chromogen TMB wurde in 10 ml Puffer/Substrat TMB verdünnt (v/v), 100 µl/Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur 30 min lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde 100 µl Stopplösung/Vertiefung zugegeben, wobei die gleiche Zeit bei der Substrat-Dosierung eingehalten wurde. Nachdem die Reaktion gestoppt wurde, wurden die Platten innerhalb der nächsten Stunde bei 450 nm, Referenzwellenlänge zwischen 615 und 690 nm photometriert.

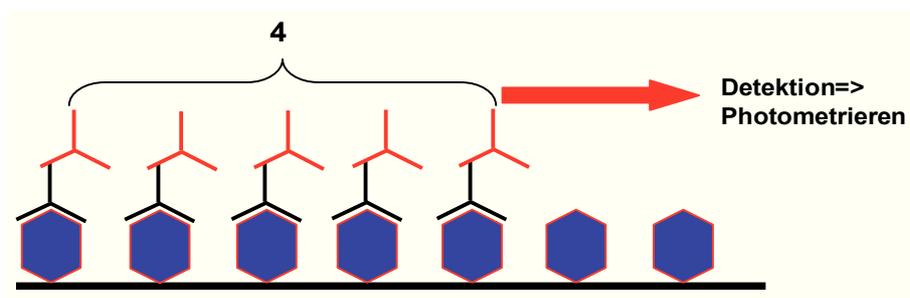
*Ab dem Punkt (siehe oben im Text) wurde die ganze Prozedur im Gerät automatisch durchgeführt (Behring ELISA Processor III, Marburg, Deutschland)



Phase 1: Beschichtung eines Antigen mit der Plastikplatte



Phase 2: Inkubation der Platte mit einem Serum



Phase 3: Inkubation des gebildeten Komplexes mit den detektierenden Antikörpern

Abb. 10 Nachweisprinzip des Anti-CMV-IgGs (Enzygnost Dade Behring)

- 1 – ELISA-Platte**
- 2 - Mit HCMV-infizierte Zellysate (gekoppelt)**
- 3 - Detektierte anti-CMV-Antikörper im Blut**
- 4 – Antihumanes (Anti-IgG) Serum**

Ein Antigen wird an die feste Phase (Plastik) gekoppelt (Phase 1). Ein Serum wird mit dem Antigen inkubiert (Phase 2). Falls im getesteten Serum Ak vorhanden sind, binden sie an das

Antigen (Phase 3). Letztendlich werden alle gebundenen Ak durch ein Antihuman-IgG-Serum detektiert (Phase 4).

3.2.2.3 Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

3.2.2.3.1 Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated Cell Sorting, Flow Cytometry)

Die FACS-Analysen wurden durch MTAs des FACS-Labors der Klinik der Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie durchgeführt.

3.2.2.3.1.1 Das Prinzip des Nachweises

Durchflusszytometrie ist eine effiziente Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung verschiedener Zellpopulationen.

Zellen werden mittels einer Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers markiert, passieren einen Laserstrahl und emittieren das Licht einer bestimmten Welllänge. Die Fluoreszenz-Emission weist auf die Expression entsprechender Oberflächenmarker hin.

3.2.2.3.1.2 Durchführung des Nachweisverfahrens.

Vor der Färbung wurden von derselben Probe die Leukozytenzahl und das Differentialblutbild mittels eines automatisierten hämatologischen Analysators bestimmt, was eine weitere Bestimmung der Absolutwerte der Lymphozytensubpopulationen aus den prozentualen Anteilen ermöglichte. Blut wurde in zwei 12 x 75 mm-Röhrchen à 200 µl gegeben. Die Röhrchen wurden mit **A** und **B**-Buchstaben gekennzeichnet. Es wurde 20 µl BD Multitest-CD3/CD8/CD45/CD4-Reagenz auf den Boden des mit **A** gekennzeichneten Röhrchens und 20 µl BD Multitest-CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19-Reagenz auf den Boden des mit **B** gekennzeichneten Röhrchens pipettiert (Tab. 10). Verschmierungen des Blutes an den Seitenrändern des Röhrchens sowie die Sedimentberührung wurden vermieden. Die Röhrchen wurden verschlossen und vorsichtig auf dem Vortexmischer gemischt. Abschließend erfolgte eine Inkubation der Proben im Dunkeln bei RT für 15 Minuten. Es wurde 450 µl der 1:10 (v/v) vorverdünnten BD Multitest Lysing Solution zu den Röhrchen gegeben. Nach dem vorsichtigen Mischen wurden die Röhrchen für weitere 15 min inkubiert.

Das Messverfahren zur Bestimmung der prozentualen Anteile der Lymphozytensubpopulationen mit der nachfolgenden Berechnung der Absolutwerte erfolgte mittels des Gerätes (BD FACS Calibur, USA) und der MultiSetTM-Software (Tab. 10).

3.2.3 Methodologische Voraussetzungen der Durchführung der Nachweisverfahren

3.2.3.1 Vortest

Da nicht bekannt war, wie viele CD16-aktivierende oder neutralisierende Antikörper ein gegebenes Serum enthält, gab es eine Wahrscheinlichkeit, ein Serum so zu verdünnen, dass das Serum den Schnittpunkt (oder 50% Neutralisation) in dem Messformat gar nicht erreicht (siehe auch „Auswertung“ im Kapitel „Fcγ-Rezeptoraktivierungs-Testverfahren“ und „Neutralisationstest“). In diesem Fall wäre kein sinnvoller Serenvergleich mehr möglich. Um diese Situation zu vermeiden, war es nötig in Erfahrung zu bringen, wie weit man ein Serum verdünnen muss, damit 50%-Neutralisation oder der Endpunkt („cut off“) beim Fcγ-Rezeptoraktivierungs-Testverfahren sicher erreicht werden können. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Vortest durchgeführt, bei dem unterschiedliche Serenverdünnungen untersucht wurden, bei denen der Unterschied relativ groß war, z.B. 1:10, 1:100, 1:1000. Nachdem die Grenzen eines sinnvollen Messbereichs grob definiert waren, wurden kleinere Verdünnungsschritte gemacht, um brauchbare Werte für weitere Berechnungen zu erhalten.

3.2.3.2 Vergleich der Antikörperfraktionen: Cytotect®-Koeffizient

Bei vielen biologischen Bestimmungsmethoden ist es nahezu unmöglich, die absoluten Ergebnisse, die bei der wiederholten Untersuchung eines großen Kontingents an Proben erhalten werden, identisch zu halten. Für die folgende Arbeit war abzusehen, dass es unmöglich ist, alle Testseren parallel zu vermessen, so dass eine Möglichkeit geschaffen werden musste, die es erlaubte, die Ergebnisse der verschiedenen Messungen zu vergleichen. Idealerweise sollten alle Proben, die verglichen werden, in einem Experiment getestet werden. Praktisch war dies aber auf Grund des Umfangs der Studie und des zeitlichen Ablaufes nicht möglich. Um die Ergebnisse von unterschiedlichen Experimenten vergleichen zu können, wurde ein Kontrollstandard, die Hyperimmunglobulinpräparation Cytotect®, mitgeführt.

Cytotect® gehört zu Gruppe von intravenösen Immunglobulinen (IVIg), die in der klinischen Infektiologie, in der Transplantationsmedizin zur passiven Immunisierung verwendet werden (Wirnsberger et al., 1999; Moiseev et al., 2002). Es handelt sich um eine gezeigte IgG-

Präparation, die polyklonales IgG gegen verschiedene Erreger enthält. Das Präparat Cytotect® enthält nachweislich eine relativ hohe Konzentration von spezifischen anti-HCMV Antikörpern (<http://www.pharmazie.com/graphic/A/06/0-80706.pdf>). Um Seren vergleichen zu können, wurde der Cytotect®-Koeffizient als Standardkontrolle errechnet. Dies bedeutet, dass Cytotect® in jedem Experiment mitgemessen wurde und dann alle Werte relativ auf den Cytotect®-Wert bezogen wurden. Dies ermöglichte, die Kinetikveränderung in der Antikörperbildung unabhängig von der Einheit zu vergleichen.

4 Ergebnisse

4.1 Evaluation des CD16-Aktivierungstests

4.1.1 Antikörperkonzentrationsabhängigkeit

Da die Messung der CD16-aktivierenden IgG-Antikörper über eine indirekte IL-2-Messung erfolgt, war es notwendig zu prüfen, in welchen Konzentrationsbereichen das produzierte IL-2 eindeutig mit der Menge des vorhandenen Antikörpers korreliert. Dafür wurde eine bestimmte Verdünnungsreihe eines HCMV-Immunsersums hergestellt (Abb. 11). Die Antigenmenge und die Menge der BW-CD16-Reporterzellen blieben in diesem Experiment konstant, so dass die Unterschiede der gemessenen IL-2-Konzentration nur von der Menge der IgG-Antikörper abhängen.

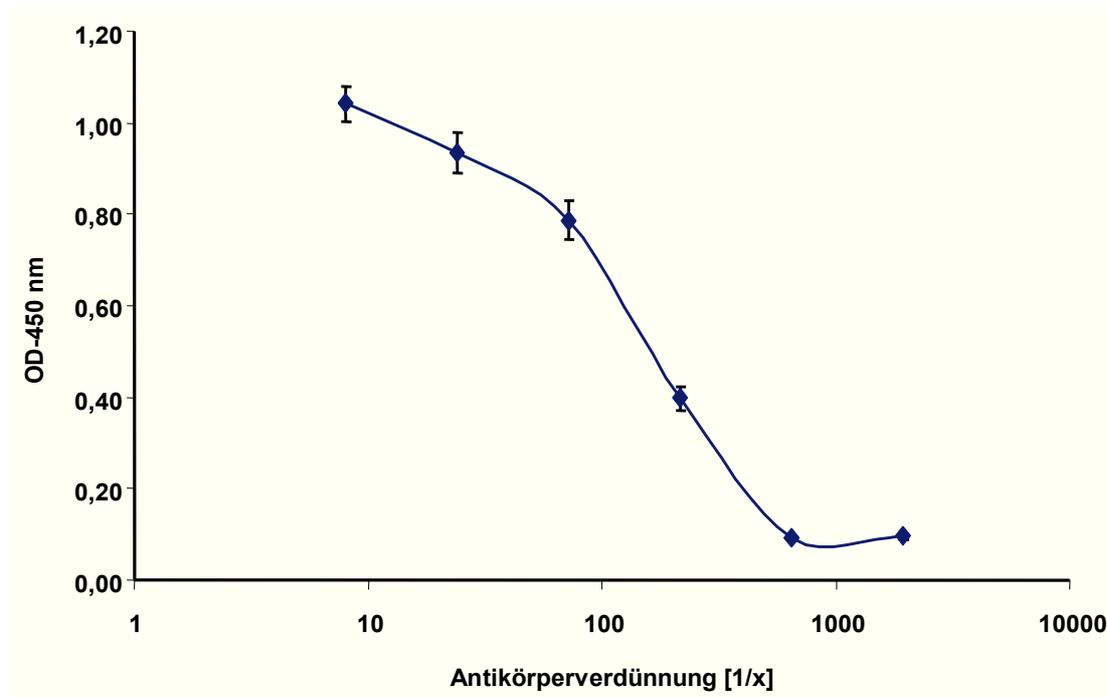


Abb. 11 Inkubation der BW-CD16-Reporterzellen mit einem HCMV-IgG-Immunsersum führt zu einer Antikörperkonzentration-abhängigen IL-2 Produktion.

MRC-5 Zellen wurden mit HCMV-AD169 (MOI 2, 72 hpi) infiziert und dann mit den angegebenen Verdünnungen der IgG-Präparation Cytotect® [1/x] und $2 \cdot 10^5$ BW-CD16-Zellen je Vertiefung über Nacht inkubiert und kokultiviert. Testwerte wurden 4-fach (n=4) bestimmt; anschließend wurde die IL-2 Produktion per ELISA quantifiziert. Angegeben ist die OD₄₅₀ des IL-2 ELISAs. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Es zeigt sich, dass die Inkubation der BW-CD16-Reporterzellen mit steigenden Antikörpermengen zu einer gesteigerten IL-2-Produktion führt. Die IL-2-Menge ist also ein Maß

für die CD16-Aktivierung resp. für die Menge an HCMV-spezifischen, CD16-aktivierenden Antikörpern in dem Serum.

4.1.2 Infektionsspezifität

Um zu überprüfen, ob die gemessenen Signale antigenspezifisch sind, wurden in jedem Experiment Kontrollen durchgeführt (Abb. 12). Als negative Kontrolle wurde ein Serum verwendet, das im ELISA keine HCMV-IgG-Antikörper enthielt. Außerdem wurde auch eine Reihe ohne Serum und eine sog. Mock-Kontrolle (uninfizierte Zielzellen) einbezogen. Nur die Seren, die gegen HCMV IgG-Ak enthielten, induzierten nachweisbare Signale. Im Falle des negativen Serums, ohne Serum und Mock-Kontrolle wurden auch Signale induziert, die als Hintergrund angenommen und bei der Schnittpunktbestimmung (*cut-off*) verwendet wurden.

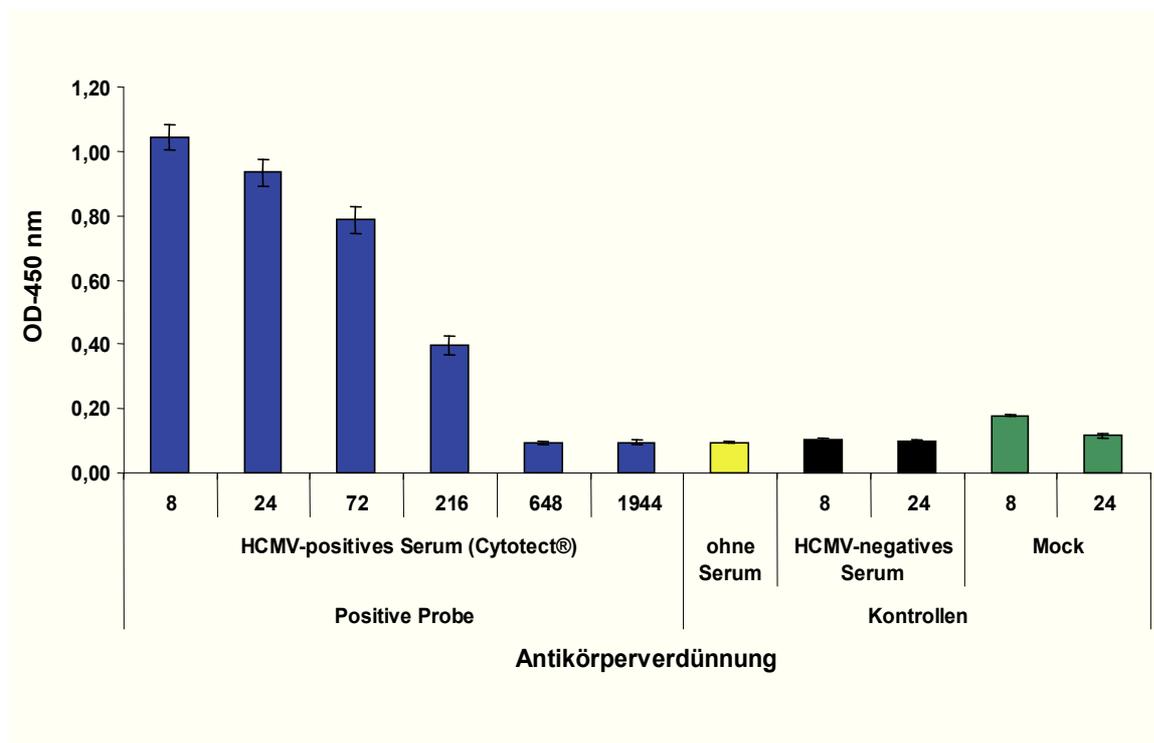


Abb. 12 Das BW-CD16-Testverfahren misst spezifische HCMV-Antigen-IgG-Antikörper-Reaktionen

MRC-5 Zellen wurden mit HCMV-AD169 (MOI 2, 72 hpi) infiziert und dann mit den angegebenen Verdünnungen der HCMV-IgG-Präparation Cytotect® [1/x] und $2 \cdot 10^5$ BW-CD16-Zellen je Vertiefung über Nacht inkubiert und kokultiviert. Testwerte wurden 4-fach (n=4), mock-Proben 2-fach (n=2) bestimmt; anschließend wurde die IL-2 Produktion per ELISA quantifiziert. Angegeben ist die OD₄₅₀ des ELISA. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Es zeigt sich somit also eindeutig eine antigenspezifische Antwort, da HCMV-seronegative Seren selbst bei hohen Konzentrationen keine CD16-Aktivierung auslösen konnten und die HCMV-seropositiven Seren auf mock-infizierten Zellen ebenfalls keine CD16-Aktivierung zeigten.

4.1.3 Zeitabhängige Antigenexpression

Das Testverfahren beruht auf Anwesenheit von Antigenen auf der Zelloberfläche. Der HCMV-Infektionszyklus benötigt üblicherweise 72 h. Um zu untersuchen, wann erstmals ein nachweisbares Signal nachgewiesen werden kann, wurde ein Experiment zur Infektionskinetik durchgeführt (Abb 13). Als Kontrollen wurde im Experiment dasselbe Virus UV-inaktiviert vermessen und eine Phosphonoessigsäure (PAA)-Behandlung durchgeführt. Bei der UV-Inaktivierung ist das Virus in der Lage, die Zelle zu infizieren, kann aber in der Zelle keine Proteine transkribieren oder replizieren, d.h., dass die Zelle keine neu synthetisierten viralen Proteine exprimiert. Die Abwesenheit der viralen Proteinsynthese führt dazu, dass auch nach 72 h Infektion keine Signale nachgewiesen werden können (Abb. 13, blaue Linie).

PAA – ein Inhibitor, der sog. „late“ – Gene blockiert, was zur selektiven Inhibition der Synthese der Proteine, die für die spätere Phase des Infektionszyklus typisch sind, führt. Als Folge werden in diesem Fall auf der Zelloberfläche keine oder nur wenige Virusantigene, die für die Erkennung durch zytotoxische Ak relevant sind, exprimiert, und es werden dabei keine positiven Signale nachgewiesen (Abb. 13, grüne Linie).

Damit konnte also gezeigt werden, dass eine nachweisbare Menge der Oberflächen-HCMV-Antigene, die für die Erkennung durch IgG-Ak entscheidend sind, erst im Zeitraum zwischen 50 und 72 Stunden gebildet werden. Der prolongierte Infektionszyklus führt scheinbar zur Verstärkung der Antigenexpression, da die Signale nach 96 hpi sich weiter deutlich erhöhen.

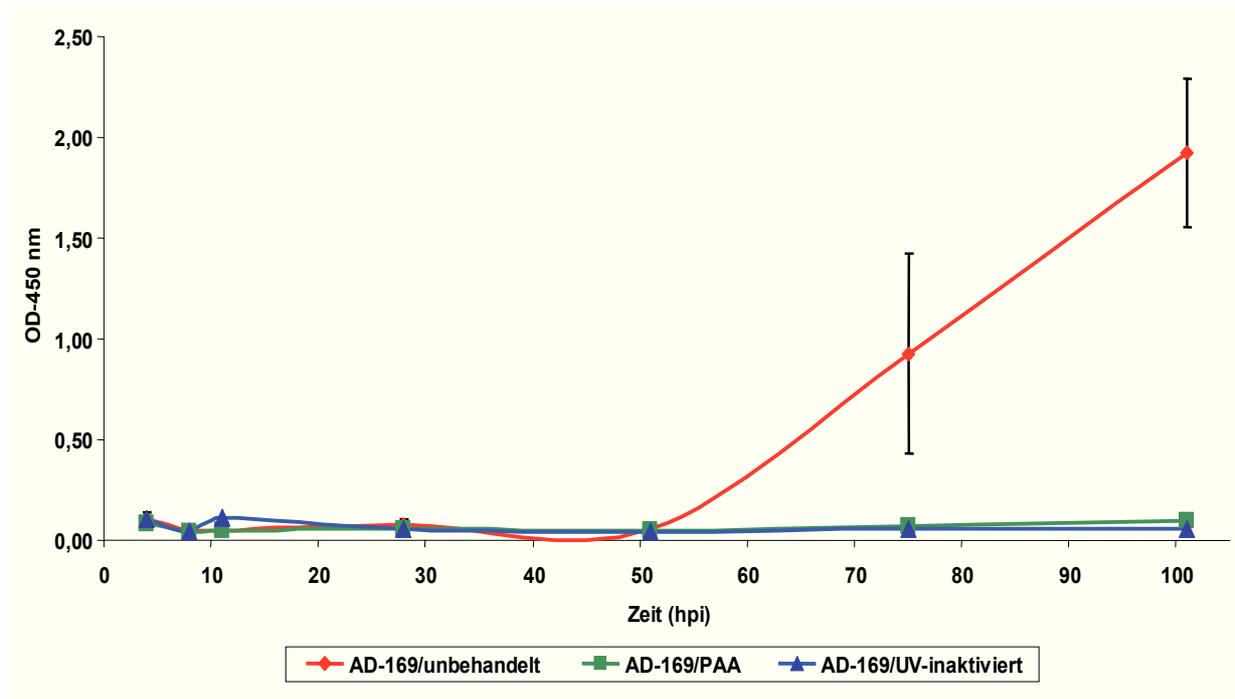


Abb. 13 Zeitabhängige Expression der CD-16-reaktiven viralen HCMV-Antigene

MRC-5 Zellen wurden mit 2 MOI HCMV-AD169 infiziert. Die Blockade der viralen *late*-Genexpression erfolgte durch Zugabe von Phosphonoessigsäure (PAA) [250 µg/ml]. Eine Inaktivierung des Virus erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (10.000 J/m²). Nach den angegebenen Zeiten wurden die infizierten Zellen mit einer 1/108 (v/v) Verdünnung Cytotect® inkubiert und anschließend mit 2 * 10⁵ BW-CD16-Zellen je Vertiefung über Nacht kokultiviert. Alle Messungen erfolgten als Doppelwerte. Die Platten wurden bei -20°C eingefroren, um nach dem Auftauen die Menge des produzierten IL-2 gleichzeitig per ELISA quantifizieren zu können. Angegeben ist die OD₄₅₀ des ELISAs. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Abstand der beiden Werte vom Mittelwert.

Die Daten zeigen also eine CD16-Aktivierung durch HCMV-Immunität, die mit dem Fortschreiten des viralen Lebenszyklus ansteigt. Die Antwort scheint hauptsächlich von neu synthetisierten Antigenen verursacht zu werden, da die UV-inaktivierten Viren keine Antwort auslösen. Die Anwesenheit von Virionen, die die Zellen nicht erfolgreich geentert haben, ist nicht in der Lage, CD16-abhängige Antworten auszulösen. Interessanterweise scheinen die CD16-reaktiven Antigene hauptsächlich *late*-Antigene von HCMV zu sein.

Zusammenfassend zeigen diese Daten somit also eine Antigen- und Antikörperabhängige Aktivierung der CD16-Reporterzellen. Dies erlaubt die Messung solcher IgG-Antikörper in klinisch-relevanten Proben.

4.2 Patienten und Probanden der Kontrollgruppe

Das Patientenkontingent bestand aus 12 erwachsenen Personen, die eine allogene Blutstammzelltransplantation erhalten hatten und während der Posttransplantationsperiode eine HCMV-Reaktivierung entwickelt haben, die durch eine positive HCMV-DNA-Bestimmung in EDTA-Blutproben belegt wurde. Als Auswahlkriterium wurden verschiedene Zeitpunkte nach PBSCT untersucht, insbesondere frühere Zeitpunkte mit virämischen Phase und spätere – in der postvirämischen Phase. Darum wurden die Patienten in zwei Phasen aufgeteilt: In die so genannte „virämische“ und die „nichtvirämische“ („postvirämische“) Phase. „Virämische“ Phase bedeutet, dass die Patienten eine aktuelle Virämie während der Beobachtungsperiode hatten, wohingegen die Patienten in der „postvirämischen“ Phase zum Moment der Beobachtung keine Virämie mehr hatten.

Zwischen den Probennahmen lagen unterschiedliche Intervalle (4-108 Tage). Parallel wurde ein Virusnachweis (PCR) durchgeführt. Aus den klinischen Informationen wurden der HCMV-Serostatus des Spenders und des Empfängers entnommen.

Als Kontrollgruppe wurden 6 gesunde, HCMV-seropositive erwachsene Probanden ausgewählt. Den Probanden wurde fünfmal Blut entnommen (0, 15, 30, 45 und 250 Tage nach Beginn der Beobachtungszeit).

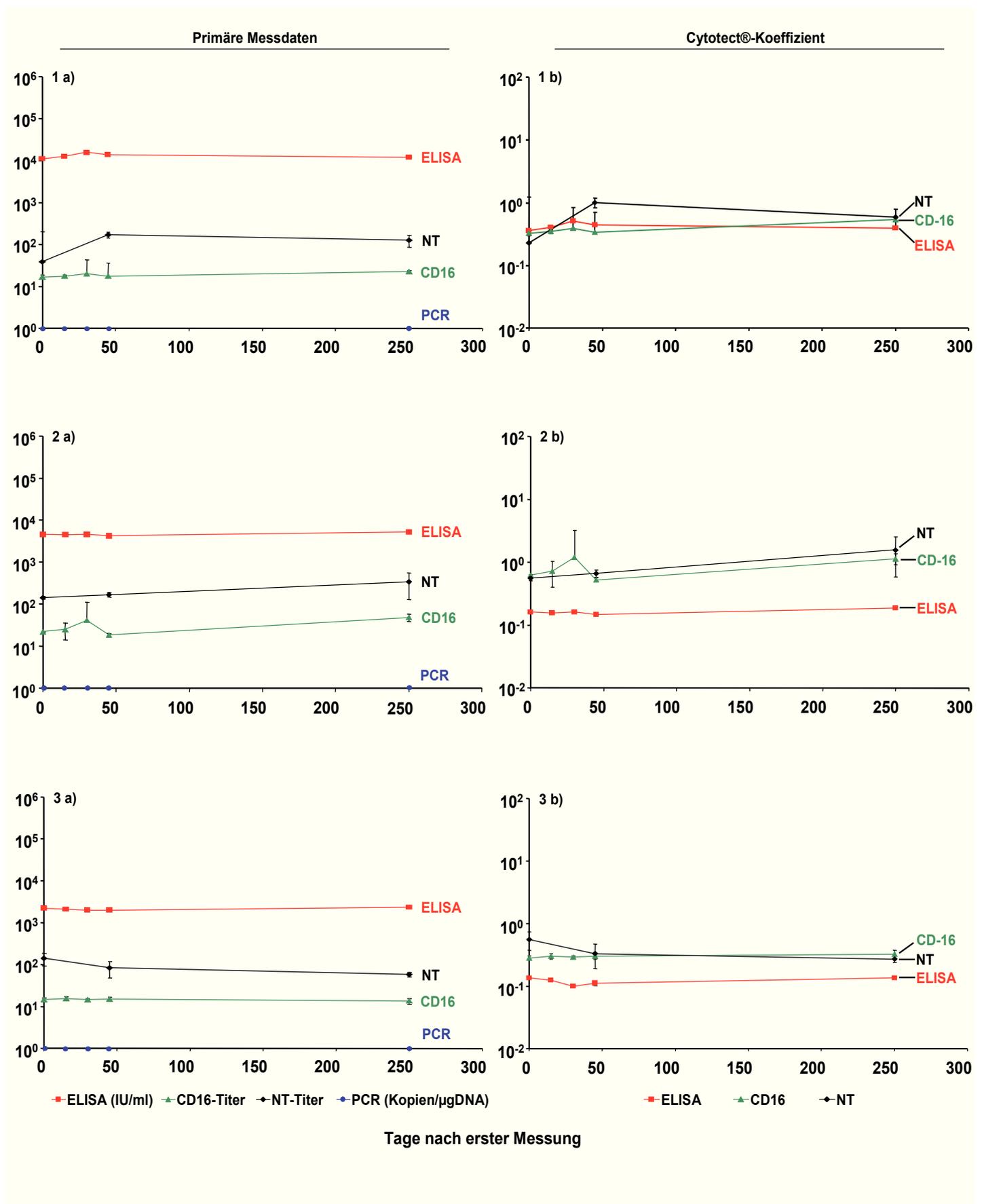
Für jeden Patienten sowie für die Kontrollprobanden werden nachfolgend exemplarisch je zwei Grafiken vorgestellt: Mit den Messeinheiten der einzelnen Nachweisverfahren und dieselbe IgG-Maßwerte bezogen auf den Cytotect®-Standard. Für die meisten Patienten (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12) waren zusätzlich von 1 bis 4 FACS-Analysen verfügbar.

4.2.1 Darstellung der Messwerte

Die unten dargestellten Grafiken zeigen auf der x-Achse den Posttransplantationszeitverlauf. Die y-Achse zeigt die Einheiten der gemessenen Messparameter wie Viruskopienzahl und jeweiliger Antikörpertiter. Im Falle des ELISA-Titers ist die etablierte Standardeinheit (IU/ml) angegeben. Der Titer der CD16-aktivierenden und neutralisierenden Antikörper ist praktische eine Verdünnung eines getesteten Serums ($1/x$, oder $1:x$), die als Schnittpunkt („cut off“) im Falle der CD16-aktivierenden Ak, und als 50%-Neutralisation im Falle der neutralisierenden Ak definiert wurde und als Kehrwert auf der y-Achse angegeben wurde (siehe auch oben im Kapitel „Auswertung“). Da es keine etablierten bzw. standardisierten Einheiten für diese zwei Antikörperklassen gibt, wurde „CD16-Titer“-Einheit für CD16-aktivierende Ak sowie „NT-Titer“-Einheit für die neutralisierende Ak angegeben.

Im Fall des Cytotect®-Koeffizient bedeuten die Kenziffern auf der y-Achse das Verhältnis aus Probe und dem Cytotect®-Referenzwert.

4.2.2 Probanden der Kontrollgruppe



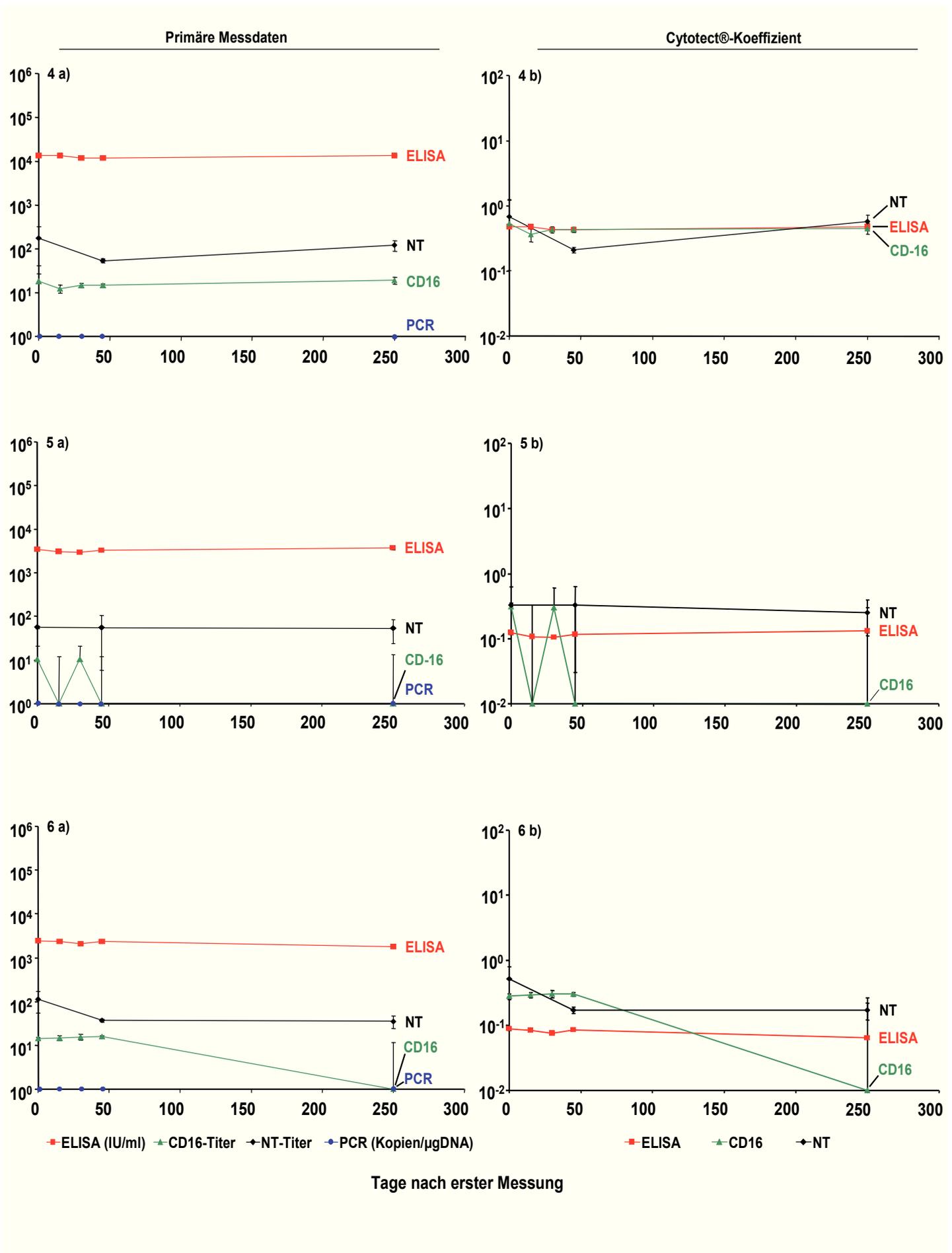


Abb. 14 (doppeltseitig) Untersuchungen der HCMV-spezifischen Antikörper der Kontrollgruppe mittels des Fcγ-Rezeptoraktivierungs-Testverfahrens, Neutralisationstests und ELISA

CD16-Titer. MRC-5 Zellen wurden mit 2 MOI HCMV Stamm AD-169, infiziert. Nach 72 hpi wurden die infizierten Zellen mit den Seren der Kontrollpersonen inkubiert und mit $2 \cdot 10^5$ BW-CD16-Zellen je Vertiefung über Nacht kokultiviert. Testwerte wurden 4-fach (n=4), mock-Proben 2-fach (n=2) bestimmt. Anschließend wurde die IL-2-Konzentration in den Überständen mittels ELISA gemessen, der Schnittpunkt („cut off“) definiert und als 1/x Verdünnung (a) und als Cytotect®-Koeffizient (b) angegeben. Die Fehlerbalken geben jeweils den maximalen Abstand der Werte vom Mittelwert an.

NT-Titer. Eine definierte Menge HCMV (20-120 pfu/Vertiefung), Stamm AD-169, wurde mit Seren 60-80 min inkubiert, die Mischung wurde anschließend mit den MRC-5 Zellen 2 bis 3 Tage inkubiert. Für jedes Serum wurde eine 3-fach Bestimmung (n=3) durchgeführt. Danach wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die gefärbten Zellen (Foci) wurden mikroskopisch gezählt und mit der Zahl der Kontrollreihe verglichen. Die Serumverdünnung, bei der die Zahl der Virusfoci 50 % im Vergleich zur Kontrollreihe betrug, wurde als Neutralisationstiter angenommen und als 1/x Verdünnung (a) und als Cytotect®-Koeffizient (b) angegeben. Die Fehlerbalken geben jeweils den maximalen Abstand der Werte vom Mittelwert an.

ELISA-Titer (Dade Behring, Enzygnost Anti-CMV/IgG). Die Seren wurden mit dem CMV-ELISA untersucht. Jedes Serum wurde 2-fach (n=2) bestimmt. Potenziell vorhandene HCMV-spezifische IgG wurde mittels anti-humanem IgG/POD-Konjugat nachgewiesen, gemessen und die Werte in IU/ml (a) und als Cytotect®-Koeffizient (b) angegeben. Die Fehlerbalken geben jeweils den maximalen Abstand der beiden Werte vom Mittelwert an.

PCR. Blut wurde in ein mit EDTA behandeltes Röhrchen abgenommen. 200 µl Probe wurde in 2 ml Probenröhrchen pipettiert. Die Proben wurde binnen 15 min eluiert, 5 µl eluierte Patientenprobe und Kontrollen wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und es wurde dazu 45 µl Supermix zugegeben. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler 7500 binnen ca. 1h 40 min. Danach wurden die erhaltenen Genomkopien mittels einer Standardkurve berechnet, auf β-Actin bezogen und als Anzahl der Genomkopien/µg DNA angegeben (a).

4.2.2.1 Schlussfolgerungen

Aus den Daten der Kontrollgruppe können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Alle Probanden aus der Kontrollgruppe weisen für die verschiedenen Antikörperqualitäten sowohl bei den frühen Messungen sowie bei der Messung nach 250 Tagen relativ konstante Werte auf. Es zeigt sich eine Korrelation aller Antikörperqualitäten untereinander. Die IgG-Mengen, die die verschiedenen anti-HCMV Effektorfunktionen auslösen, bleiben über die Zeit konstant. Während dieser Messperiode wurde bei keinem der gesunden Probanden eine Virämie nachgewiesen. Vereinzelt Serumproben zeigten sehr niedrige Titer der CD16-aktivierenden anti-HCMV IgG-Ak, die unter der Nachweisgrenze lagen.

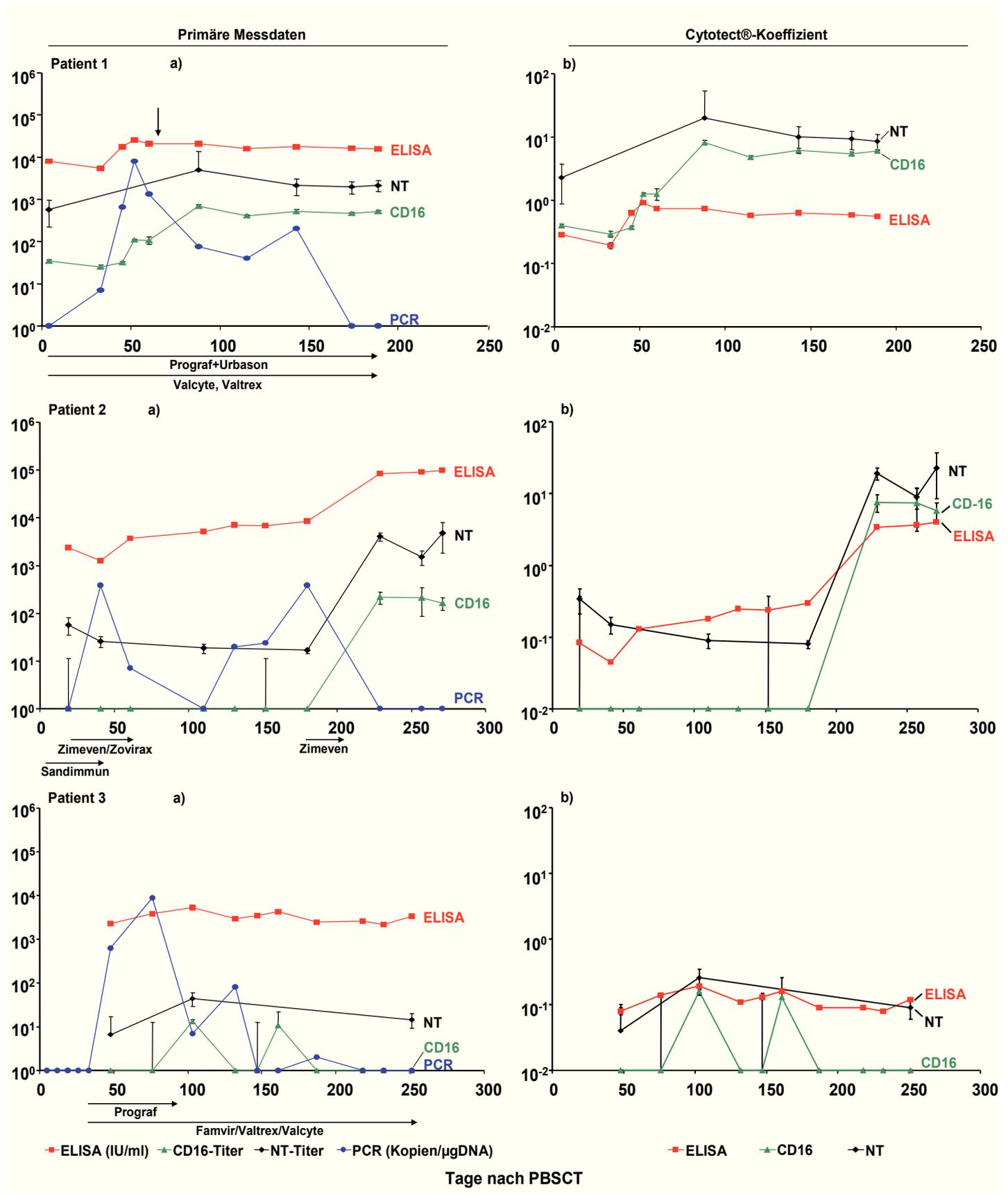
4.2.3 Tabellarische Übersicht über die Patientenkohorte.

Im Folgenden wurde die Kohorte der KMT-Patienten analysiert. Die Patienten werden einzeln vorgestellt (siehe Tabelle 11).

Tab. 11 Übersicht der untersuchten Patienten

Patient	Alter	Geschlecht	HCMV-IgG-Serostatus		Klinische Diagnose (mit ICD-10-Kodierung)	Datum der PBSCT	FACS (Tage nach PBSCT)	Untersuchungszeitraum (Tage nach PBSCT)			
			Spender (Donor)	Empfänger (Patient)				von	bis	GvHD/ Zytostatika	Virämie/ Virostatika
1	63	m	positiv	positiv	AML (C92.0)	12.01.2007	67	4	189	+	+
2	49	m	positiv	positiv	CML (C92.1)	16.11.2006	-	19	271	+	+
3	47	w	positiv	positiv	Sek. AML (C92.0)	15.11.2006	-	48	251	+	+
4	52	w	positiv	positiv	AML (C92.0)	28.07.2006	-	117	327	+	+
5	19	m	negativ	positiv	Sek. AML (C92.0)	18.08.2006	192	102	403	+	+
6	49	m	negativ	positiv	AML (C92.0)	07.04.2006	329, 398	235	461	+	+
7	66	w	positiv	positiv	AML (C92.0)	07.10.2005	424, 550, 671, 718	424	718	+	+
8	37	m	positiv	positiv	Pro-B-ALL (C91.0)	17.02.2006	419	283	584	+	+
9	39	m	positiv	positiv	CML (C92.1)	19.10.2005	587, 630	420	707	+	+
10	18	m	negativ	positiv	Prä-T-ALL (C91.5)	01.12.2005	-	362	664	+	Virämie (+), Virostatika (-)
11	44	w	negativ	positiv	AML (C92.0)	02.10.2004	886	775	1031	+	+
12	28	m	positiv	positiv	AA (D61.9)	25.10.2003	1201	1123	1390	+	+

4.2.4 Analyse der HCMV-IgG-Antworten bei Patienten in der virämischen Phase



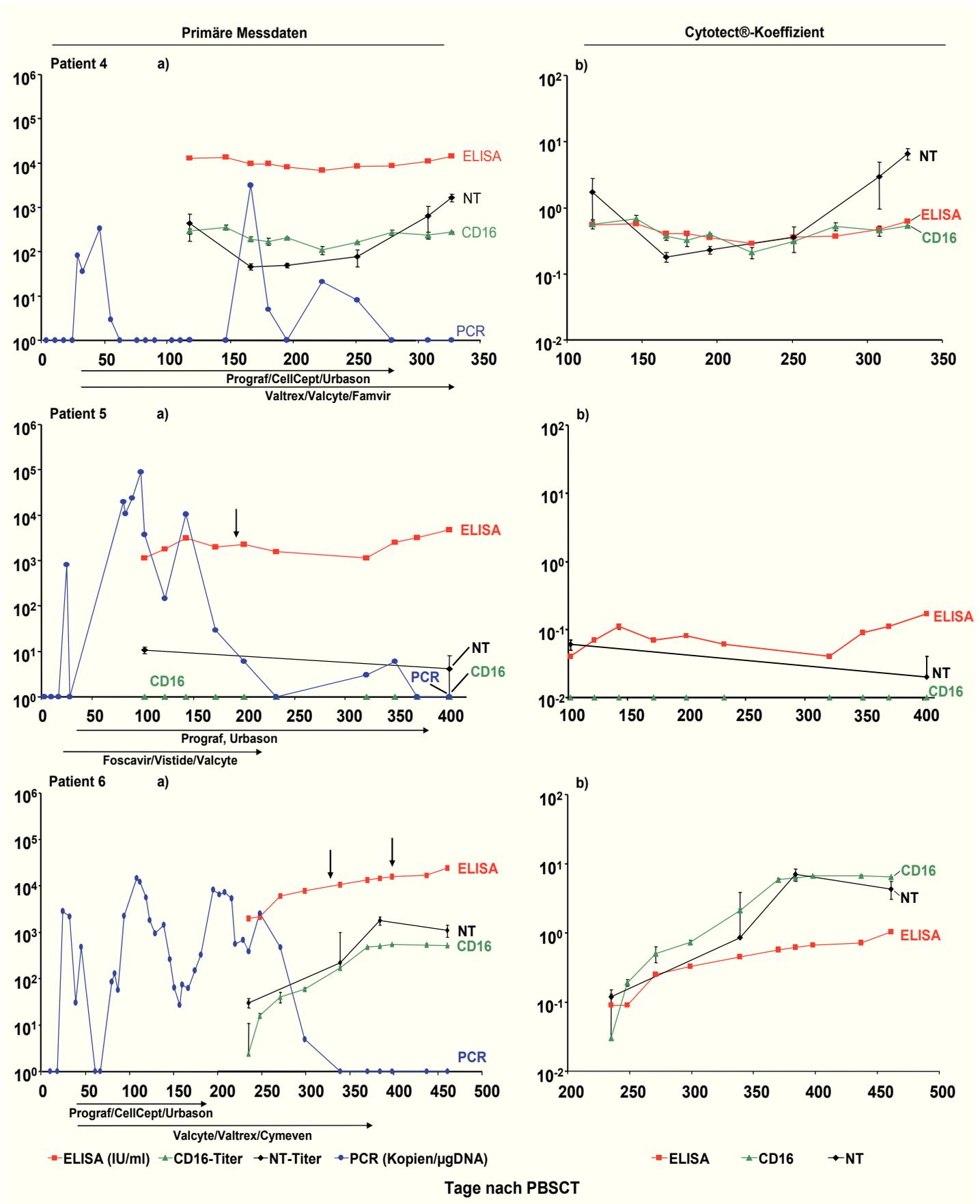


Abb. 15 (doppelseitig) Untersuchung der Antikörperbildung bei Patienten in der virämischen Phase
 Die Messungen erfolgten grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 14 angegeben. Die vertikalen Pfeile weisen auf die Tage der FACS-Messungen hin.

4.2.4.1 Patient 1

Der Patient 1 hat eine ausgeprägte Antikörperbildung gezeigt. Alle nachgewiesenen Antikörperfraktionen steigen stetig an, wobei der CD16-Titer im Vergleich zu dem gesamten ELISA-Titer am stärksten ansteigt (Abb. 15). Es wird eine deutliche Korrelation zwischen dem Antikörperanstieg und der Hemmung der Virämie beobachtet. Die Lymphozytenzusammensetzung des Immunsystems reflektiert eine typische Phase der frühen Posttransplantationsperiode: Es wird eine ausgeprägte Lymphozytopenie festgestellt (Abb. 16): Nur die CD4⁺-Lymphozyten befanden sich im Normbereich.

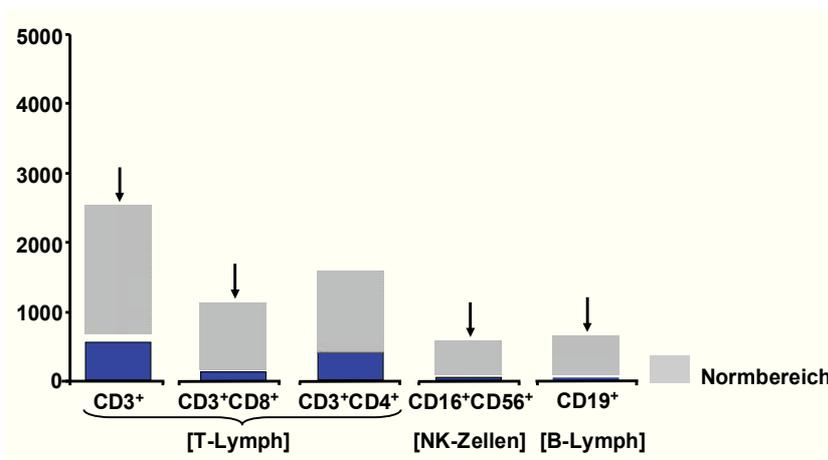


Abb. 16 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 1

Die dargestellte Messung wurde am Tag 67 durchgeführt. Blut wurde in zwei 12 x 75 mm-Röhrchen à 200 μl gegeben. Die Röhrchen wurden mit **A** und **B**-Buchstaben gekennzeichnet. Es wurde 20 μl BD Multitest-CD3/CD8/CD45/CD4-Reagenz auf den Boden des mit **A** gekennzeichneten Röhrchens und 20 μl BD Multitest-CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19-Reagenz auf den Boden des mit **B** gekennzeichneten Röhrchens pipettiert. Die Röhrchen wurden vorsichtig auf dem Vortexmischer gemischt. Abschließend erfolgte eine Inkubation der Proben im Dunkeln bei RT für 15 Minuten. Es wurde 450 μl der 1:10 (v/v) vorverdünnten BD Multitest Lysing Solution zu den Röhrchen gegeben. Nach dem vorsichtigen Mischen wurden die Röhrchen für weitere 15 min inkubiert. Das Messverfahren zur Bestimmung der prozentualen Anteile der Lymphozytensubpopulationen mit der nachfolgenden Berechnung der Absolutwerte erfolgte mittels des Gerätes (BD FACS Calibur, USA) und der MultiSetTM-Software. Die Werte sind als Zellen/μl Blut angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.4.2 Patient 2

Der Patient im frühen Zeitraum nach PBSCT. Es ist eine relativ lange virämische Periode ohne Antikörpersteigerung zu beobachten. Nach dem 200. Tag wurde ein wesentlicher Titeranstieg für alle Antikörperfraktionen festgestellt, was mit einer Hemmung der Virämie einhergeht (Abb. 15).

Diese aktive Antikörperbildung reflektiert eine erfolgreiche Immunrekonstitution und korreliert mit einer adäquaten Kontrolle von HCMV.

4.2.4.3 Patient 3

Die Patientin im frühen Zeitraum nach PBSCT. Während der Beobachtungsperiode ist keine Antikörperspiegelveränderung festzustellen. Alle drei Antikörperfraktionen sind monoton auf relativ niedrigem Niveau geblieben (Abb. 15).

4.2.4.4 Patient 4

Die Patientin hat eine stabile, über die Zeit konstant bleibende Antikörperbildung gezeigt, was die Rekonstitution der humoralen Immunantwort reflektiert (Abb. 15). Im Vergleich zu den ELISA und CD16-Titern wurde eine Korrelation zwischen der Steigerung des Neutralisationstifers und der Hemmung der Virämie beobachtet.

4.2.4.5 Patient 5

Bei diesem Patient ist eine lange virämische Periode zu beobachten. Es wurde eine schwache Immunrekonstitution in der früheren und in der späteren Posttransplantationsphase beobachtet: Es ist keine CD16-aktivierende (unter dem Detektionslimit) und nur eine schwache Neutralisationsantikörperbildung festzustellen, was mit der Anwesenheit der Virämie korreliert. (Abb. 15). Am Tag 192 wurde zwischen den Lymphozytensubpopulationen eine Unausgewogenheit beobachtet: Neben der gesteigerten Anzahl der CD8⁺-Lymphozyten wurde eine Verminderung der CD4⁺-Lymphozyten nachgewiesen (Abb. 17).

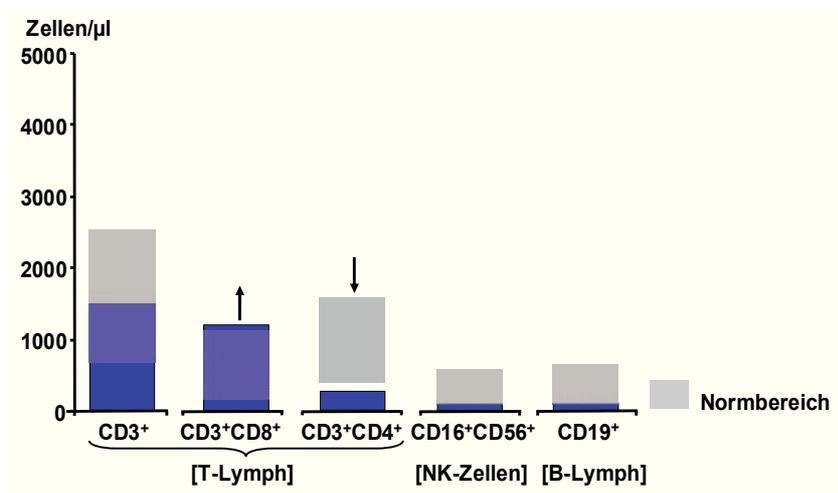


Abb. 17 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 5

Die dargestellte Messung wurde am Tag 192 durchgeführt und erfolgte grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.4.6 Patient 6

Bei diesem Patient wurde eine relativ lange anamnestiche Virämie beobachtet. Im untersuchten Zeitraum hat der Patient einen steigenden Trend in der Antikörperbildung gezeigt (Abb. 15): Es wurde ein wesentlicher Anstieg des CD16-Titers nachgewiesen, der selbst im Vergleich zu dem ELISA-Titer überproportional angestiegen ist. Dabei wurde eine Korrelation zwischen dem Antikörperanstieg und der Hemmung der HCMV-Reaktivierung beobachtet. Die Analyse der Lymphozytensubpopulation zeigt, dass im Zeitraum von Tag 329 (Abb. 18 a) bis Tag 398 (Abb. 18 b) ein ausgeprägter Anstieg der Zahl der NK-Zellen beobachtet wurde.

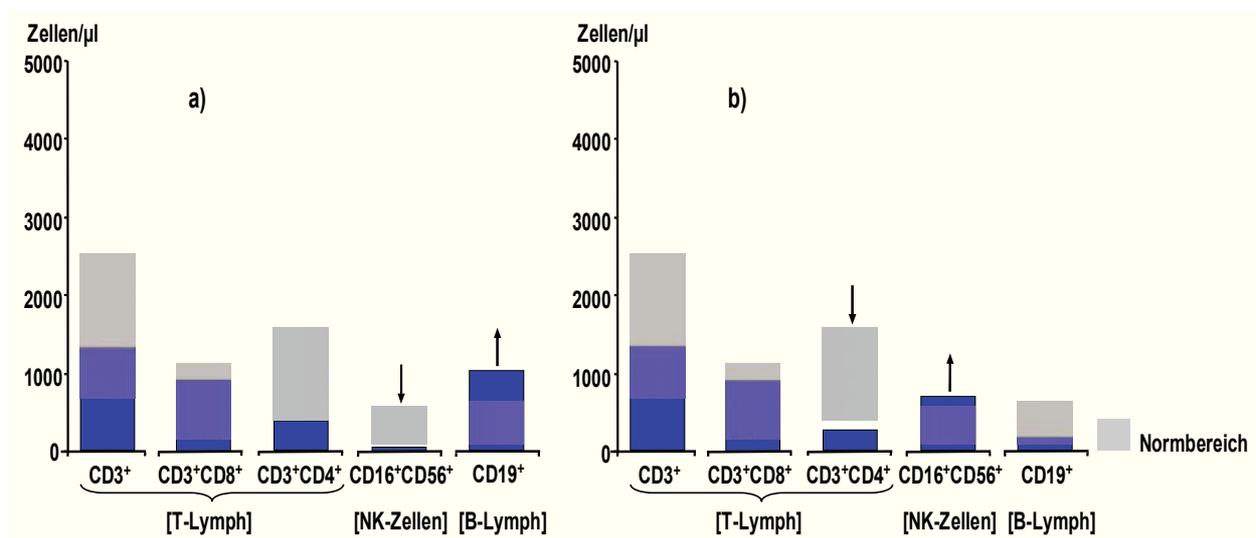


Abb. 18 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 6

Die dargestellten Messungen wurden am Tag am Tag 329 (a) und 398 (b) durchgeführt und erfolgten grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.4.7 Schlussfolgerungen

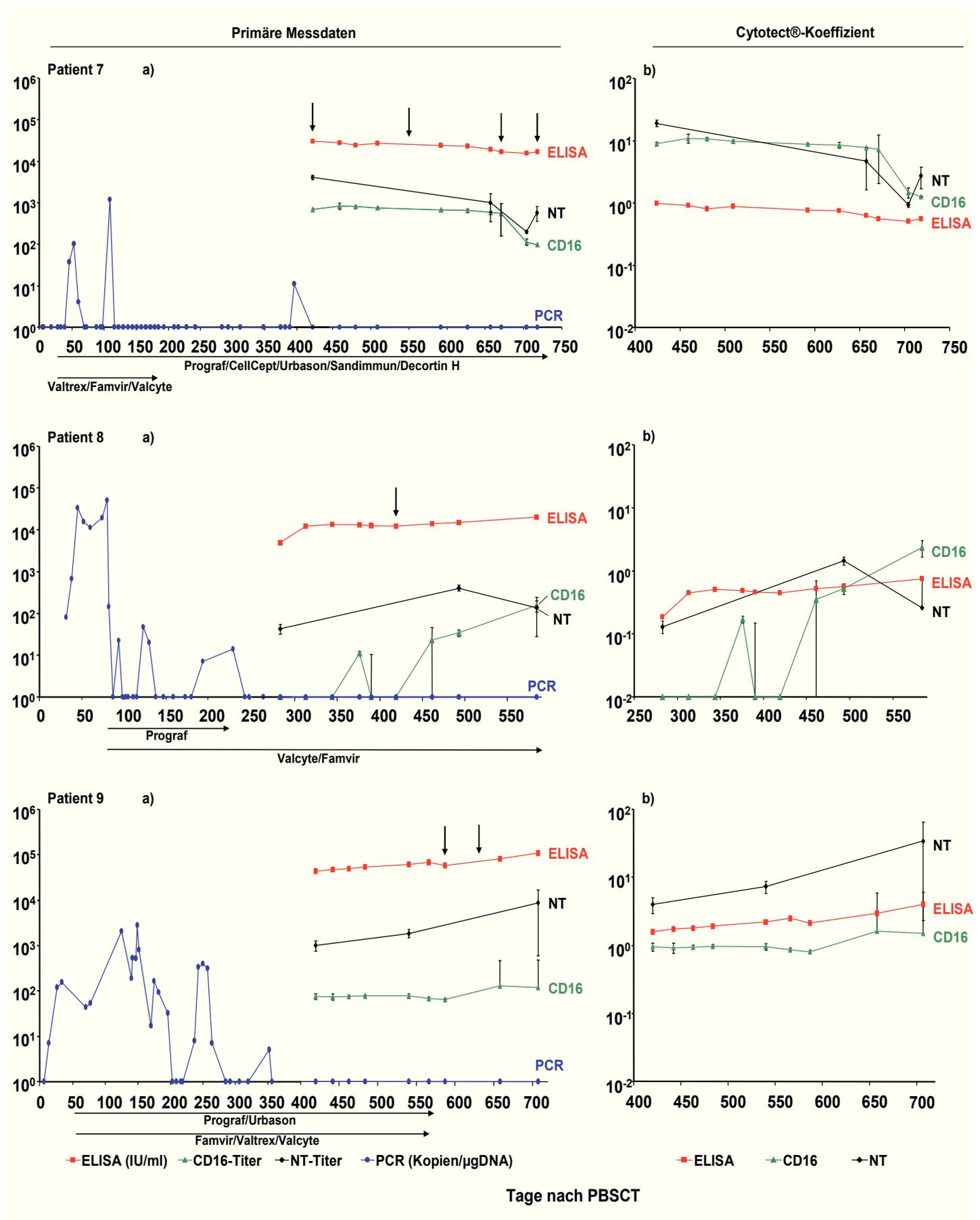
In der Gruppe der Patienten in der früheren virämischen Phase nach der PBSCT wurden große und individuelle Unterschiede der Antikörperbildungskinetik im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu der Gruppe von Patienten in der späteren Zeitpunkten nach Transplantation (siehe weiter) nachgewiesen. Von sechs Patienten, bei denen Virus- und Antikörpernachweisverfahren durchgeführt wurden, haben nur drei Patienten (Patient 1, 2 und 6, 50% der Subkohorte) einen ausgeprägten Titeranstieg gezeigt, wobei alle drei IgG-Fractionen (ELISA-, CD16- und NT-Titer) angestiegen sind. Hierbei bestand einmal eine Hochrisiko-Konstellation (CMV-

Seropositiver Empfänger bei CMV-Seronegativen Donor, Patient 6, siehe weiter in der Diskussion), in 2 Fällen handelte es sich um eine Konstellation mit geringerem Risiko (CMV-Seropositiver Empfänger/CMV-seropositiver Donor, Patienten 1, 2). Man muss betonen, dass dabei der CD16-Titeranstieg wie der Neutralisationstiter im Vergleich zum ELISA-Titer einen überproportionalen Anstieg zeigte. Wird der Cytotect®-Koeffizient berechnet, wird dieser Anstieg besonders deutlich.

Die anderen drei „virämischen“ Patienten (Patienten 3, 4 und 5, 50% der Subkohorte) haben im vergleichbaren Zeitraum keinen wesentlichen Antikörpertiteranstieg entwickelt. Patientin 4 hat eine stabile, im NT-Assay jedoch leicht ansteigende Antikörpermenge gezeigt. Die Hemmung der Virämie hat also vermutlich mit dem Anstieg der neutralisierenden Antikörper korreliert (siehe in Diskussion).

In den FACS-Messungen wurden meistens normale oder verminderte Werte für die jeweiligen Lymphozytensubpopulationen nachgewiesen. Eine offensichtliche Korrelation zwischen der Anzahl der NK-Zellen, dem CD16-Titer und der Hemmung der Virämie wurde bei Patient 6 festgestellt.

4.2.5 Analyse der HCMV-IgG-Antworten bei Patienten in der postvirämischen Phase



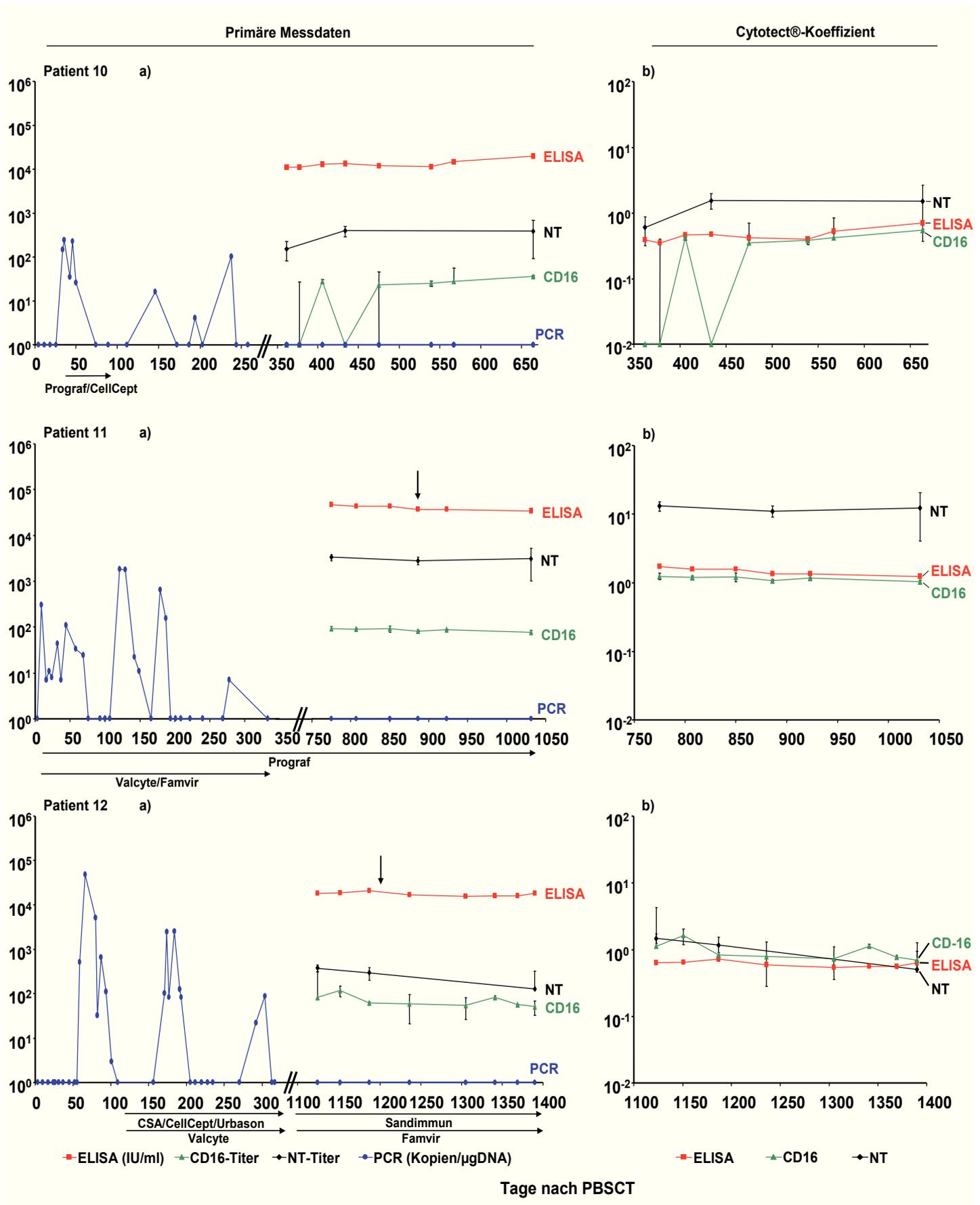


Abb. 19 (doppelseitig) Untersuchung der Antikörperbildung bei Patienten in der postvirämischen Phase
 Die Messungen erfolgten grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 14 angegeben. Die vertikalen Pfeile weisen auf die Tage der FACS-Messungen hin.

4.2.5.1 Patient 7

Die erste Antikörpermessung erfolgte ab 28 Tagen nach der letzten nachgewiesenen Virämie und bzw. 424 Tage nach der PBSCT. Es wurden in der „virämischen“ Posttransplantationsphase relativ kurze Virämieepisoden nachgewiesen. Es wird eine stabile, über die Zeit konstant bleibende Antikörperkonzentration im ELISA beobachtet (Abb. 19). Es gibt eine Tendenz zur Senkung der NT- und CD16-Titer. Die Messungen der Lymphozytensubpopulation zeigen starke Schwankung der Zellzahl, wobei bei einigen Messungen der physiologische Normbereich verlassen wurde (Abb. 20)

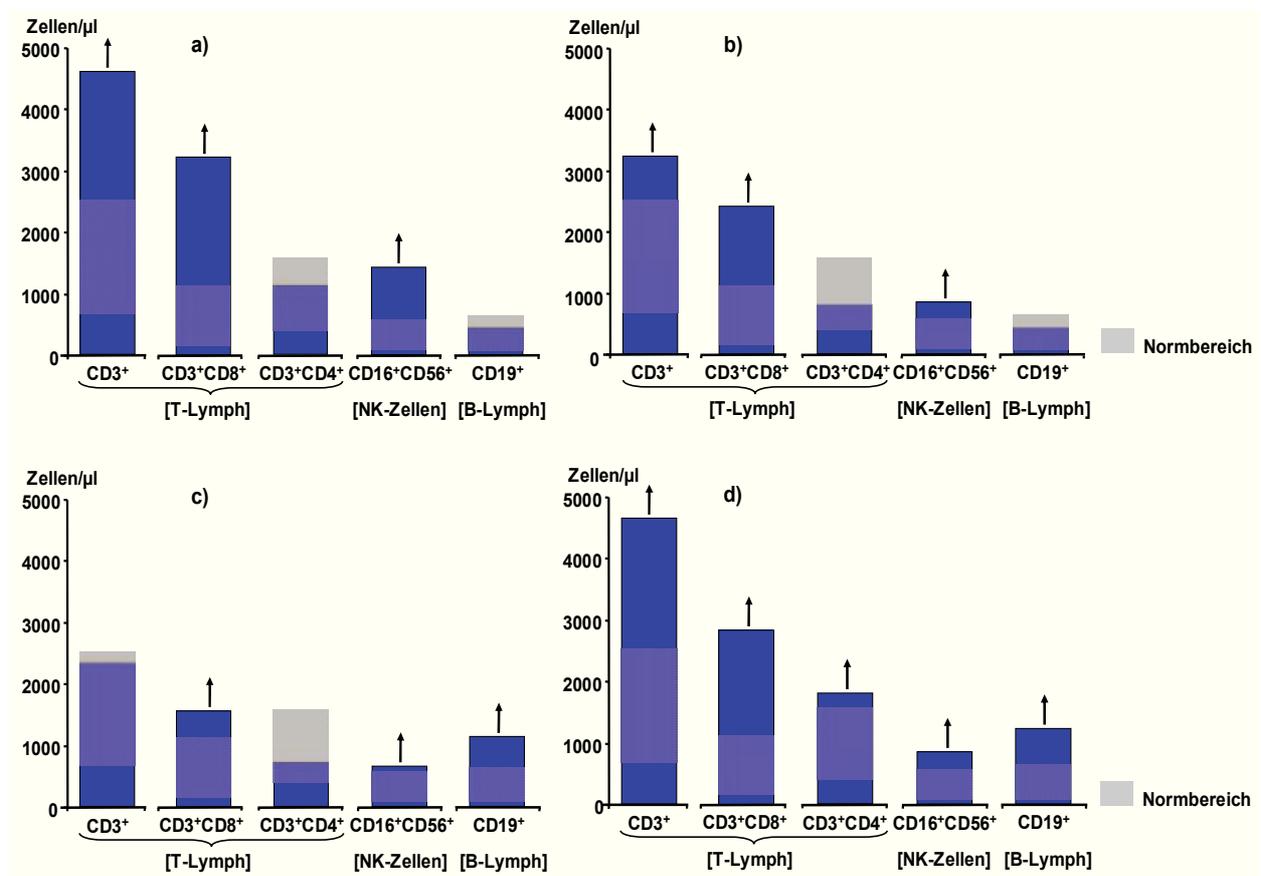


Abb. 20 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 7.

Die dargestellten Messungen wurden am Tag 424 (a), 550 (b), 671 (c) und 718 (d) durchgeführt und erfolgten grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.5.2 Patient 8

Die erste Antikörpermessung wurde nach 53 Tage nach der letzten nachgewiesenen Virämie und somit 283 Tage nach Transplantation vorgenommen. Anamnestisch hat der Patient eine

Virämieperiode gezeigt (Abb. 19). In dem Antikörperprofil im beobachteten Zeitraum wurde eine Steigerung des ELISA-Titers beobachtet, die mit der Kinetik des CD16-Titers korreliert. Es wurde eine Variabilität des CD16-Titers mit einem positiven Trend nachgewiesen. Der Neutralisationstiter blieb jedoch relativ konstant. Die FACS-Messung zeigt eine Unausgewogenheit zwischen den einzelnen Lymphozytensubpopulationen (Abb. 21).

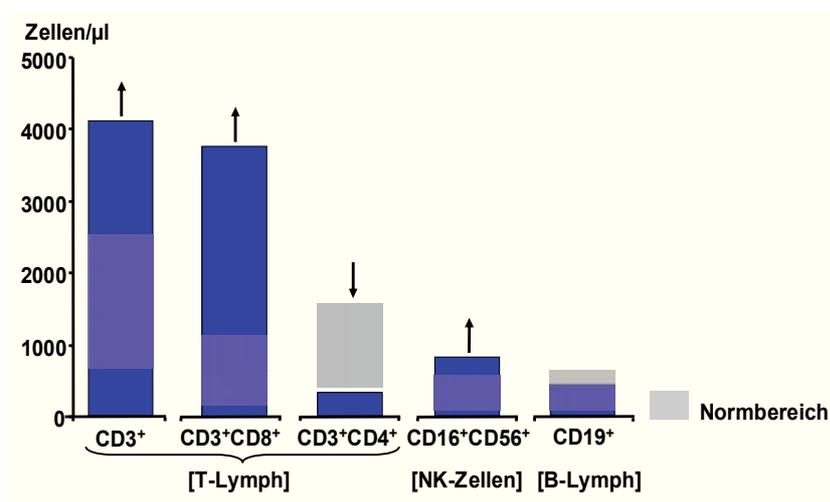


Abb. 21 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 8

Die dargestellte Messung wurde am Tag 419 durchgeführt und erfolgte grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.5.3 Patient 9

Die erste Antikörpermessung erfolgte 53 Tage nach der letzten nachgewiesenen Virämie bzw. 405 Tage nach der Transplantation. Der Patient hatte anamnestisch eine relativ lange Virämieperiode (Abb. 19). Im Antikörperprofil wurde ein relativ hoher ELISA-Titer nachgewiesen, wobei eine schwache Titersteigerung über die Zeit beobachtet wurde. Der CD16-Titer ist über die Zeit relativ konstant geblieben. In den Lymphozytensubpopulationen wird eine Unausgewogenheit zwischen den verschiedenen Zellen nachgewiesen, wo neben der Lymphozytose (CD8⁺ am Tag 587 und 630 und NK-Zellen am Tag 630) eine Senkung der CD4⁺-Lymphozyten in den beiden Zeitpunkten nachgewiesen wurde (Abb. 22).

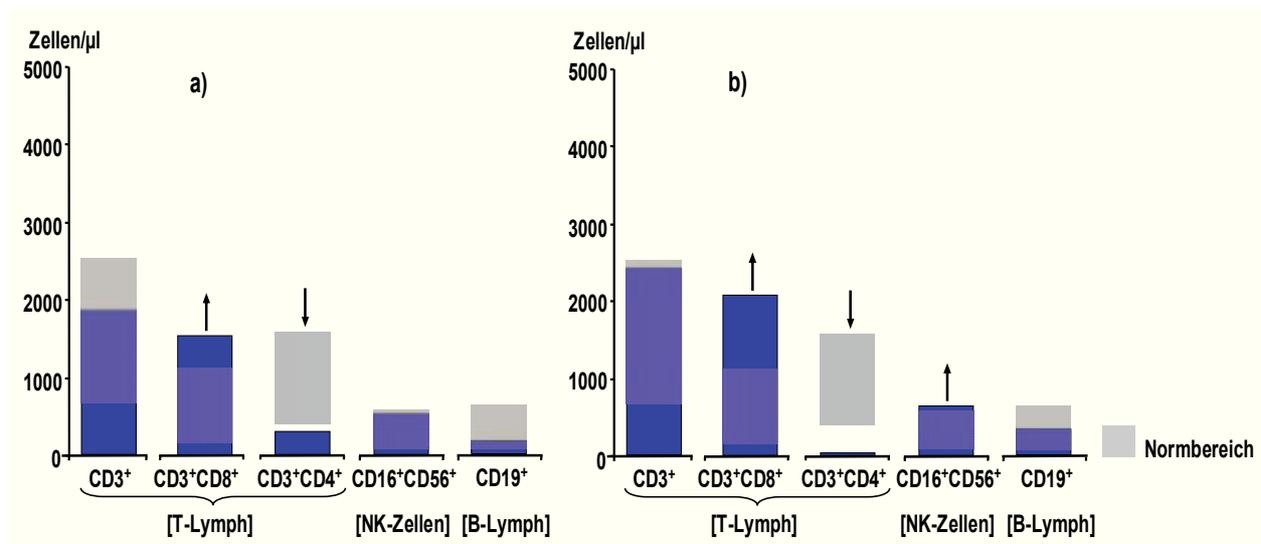


Abb. 22 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 9

Die dargestellten Messungen wurden am Tag 587 (a) und 630 (b) durchgeführt und erfolgten grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.5.4 Patient 10

Die erste Antikörpermessung erfolgte ab 124 Tagen nach der letzten nachgewiesenen Virämie und bzw. 362 Tage nach der Transplantation. Trotz einer erhöhten HCMV-Reaktivierungswahrscheinlichkeit (siehe Risikokonstellation in der Tabelle 11) hat der Patient in der späteren Posttransplantationszeit eine erfolgreiche Immunrestitution gezeigt: Es wurde keine Virämie mehr beobachtet und alle Antikörperfraktionen hatten eine ähnliche konstante und relativ monotone Bildungstendenz (Abb. 19).

4.2.5.5 Patient 11

Die ersten Messungen erfolgten 497 Tage nach der letzten nachgewiesenen Virämie und somit 775 Tage nach der Transplantation. Die Patientin hat in der Anamnese mehrere HCMV-Virämieepisoden entwickelt (Abb. 19). Sie hat über die Beobachtungsperiode eine stabile Antikörperbildungskinetik gezeigt. Es wurden relativ hohe Mengen an HCMV-reaktivem ELISA- und NT-IgG beobachtet. Es wurde in etwas der Antikörperbildungstrend der gesunden Kontrollgruppe erreicht und es war keine weitere Virämie mehr nachweisbar. In den Lymphozytensubpopulationen wurde eine Lymphozytose hinsichtlich der NK-Zellen und B-Lymphozyten nachgewiesen (Abb. 23).

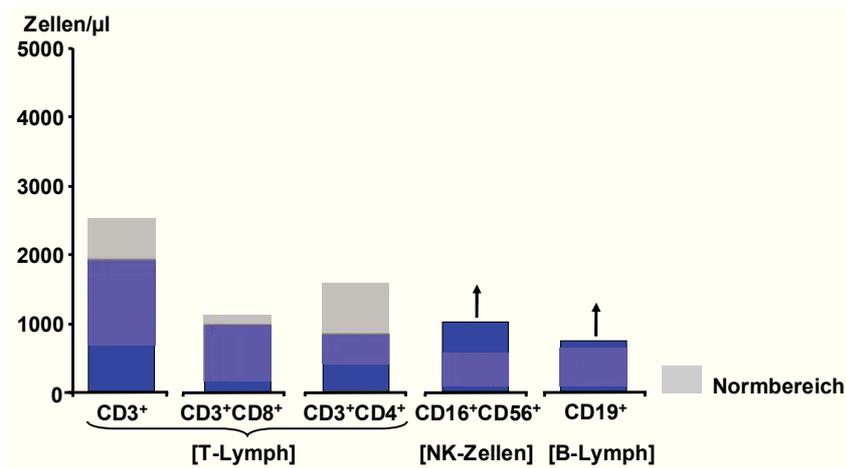


Abb. 23 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 11

Die dargestellte Messung wurde am Tag 886 durchgeführt und erfolgte grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.5.6 Patient 12

Die ersten Antikörpermessungen wurden 819 Tage nach der letzten nachgewiesenen Virämie bzw. 1123 Tage nach der Transplantation vorgenommen. Es wurde ein stabiler Trend der Antikörpermenge nachgewiesen (Abb. 19). Alle drei IgG-Fractionen blieben in der beobachteten Zeit relativ konstant. Die Vergleichsparameter der Kontrollgruppe wurden erreicht. In den Lymphozytensubpopulationen wurde eine Senkung der Zahl der CD4⁺-Lymphozyten nachgewiesen (Abb. 24).

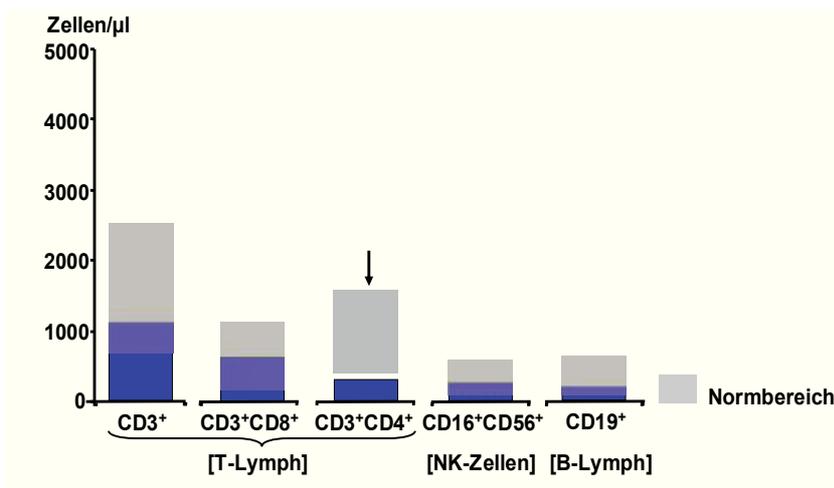


Abb. 24 Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen beim Patient 12

Die dargestellte Messung wurde am Tag 1201 durchgeführt und erfolgte grundsätzlich wie im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben und in Abb. 16 angegeben. Die Pfeile weisen auf einen Anstieg (↑) oder eine Senkung (↓) einer Lymphozytensubpopulation hin.

4.2.5.7 Schlussfolgerungen

Die Patienten in der „postvirämischen“ Phase nach Transplantation haben in der Antikörperproduktionskinetik die Tendenz gezeigt allmählich konstant zu werden und zur späteren Zeit nach der letzten nachgewiesenen Virämie die Parameter der Kontrollgruppe zu erreichen, was für eine adäquate Immunrekonstitution spricht. In der früheren Zeit nach der letzten nachgewiesenen Virämie wurde jedoch eine relativ instabile Kinetik der einzelnen Antikörpertiter festgestellt (Patienten 7, 8, 9), wogegen bei den Patienten in den späteren Zeitpunkten (10, 11, 12) die Antikörpertiter stabiler waren. In der beobachteten Zeit hat das Immunsystem HCMV erfolgreich kontrolliert und es war keine nachweisbare Virämie mehr festzustellen. Neben der stabilen und relativ monotonen Antikörpermenge wurde für die zelluläre Immunität eine Unausgewogenheit nachgewiesen: Je nach Subpopulationen wurden teilweise verminderte aber eben auch gesteigerte Kennziffern für andere Lymphozytensubpopulationen nachgewiesen.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurde erstmals ein Versuch unternommen, eine definierte Antikörperqualität (CD16-Aktivierung) nach PBSCT qualitativ nachzuweisen und zu quantifizieren. Im Mittelpunkt der Studie stand die neu entwickelte Messmethode für Fc γ -rezeptoraktivierende IgG-Antikörper (Corrales-Aguilar, 2008). Vor dieser Studie gab es keinerlei Information zur Rekonstitution der ADCC-abhängigen Ak-Produktion. Die CD16-aktivierenden CMV-IgG Antikörperkonzentrationen wurden dabei mit der Konzentration von CMV-ELISA-reaktiven und CMV-neutralisierenden IgGs verglichen.

5.1 Einfluss durch CMV-spezifische Behandlungsverfahren der Patienten

5.1.1 Antivirale Therapie

Da alle Patienten in der früheren Phase nach der PBSCT HCMV-Reaktivierungsepisoden zeigten, wurden sie dementsprechend mit verschiedenen Virostatika behandelt (Abb. 15, 19). Neben den Antikörperanstiegen bei manchen Patienten und der Korrelation hinsichtlich der Hemmung der Virämie muss darauf hingewiesen werden, dass die Virostatikaverabreichung eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Virämie gespielt haben wird.

5.1.2 Intravenöse Immunglobulinpräparationen (IVIG)

Das CMV-Hyperimmunglobulinpräparat Cytotect® wird zur passiven Immunisierung bei CMV-Patienten verwendet. Es wurde hier zur Standardisierung der CMV-spezifischen IgG-Antworten eingesetzt. Cytotect® enthält deutlich höhere Konzentrationen CMV-spezifischer Antikörper als andere IVIG-Präparationen (H.Reinhard und H.Hengel, nicht veröffentlichte Daten). In dieser Studie wurden die untersuchten Patienten mit einem anderen kommerziell hergestellten IgG-Präparation (Gamunex®) behandelt. Da die Messmethoden (ELISA, Fc γ -Rezeptoraktivierungstestverfahren) auf der Messung der IgG-Fraktion des jeweiligen Serums basiert, war es grundsätzlich wichtig zu untersuchen, ob die Vergabe dieser IgG-Präparationen den nachgewiesenen Antikörperspiegel der Patienten beeinflussen und mögliche Interferenzen mit dem Nachweis der endogenen IgG-Menge verursachen können.

Exemplarisch wird dieses mögliche Problem am Beispiel der Messung eines Patienten dargestellt, der solche Präparate erhalten hat. Patient 5 (Abb. 15) hat während der ca. 120 Tage des virämischen Zeitraums 20 g/Infusion Gamunex® (11-mal) intravenös erhalten. Wie man der Grafik entnehmen kann, bleibt bei dem Patient: a) der ELISA-Titer trotz der mehrmaligen

Infusionen unverändert, b) der CD16-Titer negativ und c) der Neutralisationstiter konstant niedrig. Das heißt, dass die IVIG-Gaben auf die gemessenen Werte keinen wesentlichen Einfluss ausgeübt haben, da sonst eine signifikante Veränderung nach der Gamunex®-Vergabe zu erwarten gewesen wäre. Andererseits legen diese Ergebnisse nahe, dass die üblichen Immunglobulinpräparate wie Gamunex® - im Vergleich zu den von Patienten produzierten Antikörperspiegeln – sehr geringe Mengen CMV-spezifischer IgG-Antikörper enthalten.

5.2 Diskussion der erhaltenen Ergebnisse

5.2.1 HCMV-Virämie

Wie oben gezeigt wurde, haben alle hier untersuchten Patienten nach der PBSCT eine HCMV-Virämie entwickelt. Da die Patientenauswahl nicht rein zufällig war, kann man daraus nicht schlussfolgern, dass alle Patienten nach PBSCT unbedingt eine CMV-Infektion entwickeln. Die hier gezeigten Daten sind jedoch mit publizierten Daten konsistent, welche zeigen, dass tatsächlich viele, aber nicht alle transplantierten Personen, die entsprechenden Voraussetzungen hatten (HCMV-Infektion in der Anamnese des Patienten und/oder des Spenders), in der Posttransplantationsperiode virämische Episoden gezeigt haben. In einer publizierten Studie hatten von 45 untersuchten Patienten 39 eine HCMV-Virämie (Lilleri et al., 2008).

Diskutiert man das Reaktivierungsrisiko in der Posttransplantationsphase, muss man unbedingt den HCMV-Serostatus bzw. die latente HCMV-Infektion bei dem Empfänger und/oder dem Spender in die Betrachtung mit einbeziehen (Matthes-Martin et al., 2002). Theoretisch kann man vier mögliche Konstellationen definieren: #1. Spender (-)/Empfänger (-), #2. Spender (+)/Empfänger (+), #3. Spender (+)/Empfänger (-), #4. Spender (-)/Empfänger (+).

Die ersten 2 Konstellationen lassen sich in eine sog. Niedrigrisikogruppe einreihen. Dies wird damit erklärt, dass im Fall #1 weder Donor (Spender) noch Empfänger HCMV-infiziert sind. Im Fall #2 hat sowohl der Spender, als auch der Empfänger das Virus, d.h., dass der Empfänger mit dem Transplantat möglicherweise auch HCMV-spezifische Immunzellen erhält, was einen schützenden Effekt hat.

Die Konstellationen #3 und #4 gehören zu der sog. Hochrisikogruppe. Im Falle #3 hat der Spender selbst HCMV, und kann es auf den HCMV-negativen Empfänger übertragen und diesen so infizieren. Die schwerste klinische Situation ist beim Fall #4 zu erwarten. In diesem Fall hat der Empfänger HCMV, und bei der Transplantation von einem HCMV-negativen Spender erhält er keine HCMV-spezifischen immunkompetenten Zellen, die das Virus kontrollieren könnten. In dieser Studie wurden nur Patienten mit den Konstellationen #2 und #4 untersucht. Von 12

Patienten waren 4 Patienten in der Hochrisikogruppe, und hatten die Konstellation #4 („Spender (-)/Empfänger (+)“

5.2.2 Untersuchung der Antikörperbildung

5.2.2.1 HCMV-seropositive Kontrollgruppe

Der regelmäßig durchgeführte Antikörperrnachweis über einen Zeitraum von 250 Tagen zeigte, dass die Antikörpermenge bei diesen Probanden über die Zeit konstant blieb, d.h., dass die Messungen keine große Variabilität zeigten. Dabei ist zu betonen, dass alle CMV-Antikörperfraktionen gleichermaßen konstant blieben. Die Relationen zwischen den einzelnen Antikörperfraktionen blieben über den beobachteten Zeitraum dadurch ebenfalls konstant, d.h. dass der CD16-Titer fast immer parallel zum ELISA-Titer verlief. Bei einigen Probanden konnte man in manchen Messungen jedoch gar keinen CD16-Titer nachweisen. Ausgehend davon, dass diese Probanden während der Beobachtungszeit keine nachweisbare Virämie entwickelt haben, kann man feststellen, dass die Antikörpertiter trotz nicht nachweisbarer HCMV-Titer konstant bleiben. Da die Halbwertszeit von IgG-Antikörpern zwischen 7 und 21 Tagen, d.h. < 250 Tagen liegt (<http://www.xs4all.nl/~ednieuw/IgGsubclasses/subkl23.htm>), kann man schlussfolgern, dass die für den Erhalt der einzelnen Antikörperqualitäten (z.B. CD16-Aktivierung) erforderlichen Virusmengen unterhalb einer nachweisbaren CMV-Reaktivierung mit einer Virämie liegen.

5.2.2.2 Patienten

Die zwölf untersuchten Patienten wurden auf zwei Gruppen aufgeteilt. Sechs Patienten, bei denen die Antikörperkonzentration während der akuten Virämie untersucht wurde (Patienten 1-6), haben verschiedene Antikörperbildungskinetiken demonstriert. Zwei Patienten davon (5 und 6) waren in der Gruppe mit der hohen Transplantatrisiko-Konstellation: Spender (-)/Empfänger (+). Die anderen hatten Spender (+)/Empfänger (+) Konstellationen.

Patient 5 hatte am Anfang der Beobachtungsphase sowie in der Anamnese eine schwere und längere HCMV-Virämie. Trotz einer „starken“ Antigenstimulation hat er während dieser Periode keine adäquate humorale Immunantwort entwickelt (keine nachweisbaren CD16-aktivierenden IgG und ein sehr niedriger Neutralisationstiter) und dementsprechend konnte er die Virämie nicht selbstständig kontrollieren. Im Gegensatz dazu hat Patient 6 mit der gleichen Transplantationsrisikokonstellation eine gute Antikörperbildung entwickelt, die auch mit der erfolgreichen Kontrolle der Virämie korreliert.

Die Patienten 1-4 bilden die Gruppe mit der niedrigen Risikokonstellation. Die Patienten 1 und 2 haben während der Beobachtungsperiode einen ausgeprägten Antikörperanstieg entwickelt. Man muss unterstreichen, dass die Antikörperbildung bei Patient 1 jedoch von Virämieepisoden begleitet wurde, obgleich nach dem Antikörperanstieg (Messpunkte 5, 6) der Virustiter gesunken ist. Im Falle des Patienten 2 kann man diesen Anstieg später, zwischen dem Tag 150 und 200, beobachten. Wie in den Fällen 1 und 6, gibt es eine Korrelation zwischen der Antikörpertitersteigerung und der Hemmung der Virusreplikation. Hinsichtlich der Divergenzen zwischen dem ELISA-Titer und dem CD16-Titer muss betont werden, dass der CD16-Titer bei Patienten 1 und 6 im Vergleich zum ELISA-Titer stärker angestiegen ist. Das bedeutet, dass es gelungen ist, mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Antikörpernachweisverfahren eine Antikörperfraktion nachweisen zu können, die mit dem traditionellen ELISA-System nicht nachgewiesen werden konnte. Das zeigt, dass der ELISA-Titer nicht immer den Titer der CD16-aktivierenden Antikörper reflektiert. Gleiches gilt auch für den CMV-NT Titer. Die Patienten 3 und 4 haben ähnliche Antikörperbildungskinetiken: Es gibt keine wesentliche Titersteigerung; alle Antikörperfraktionen bleiben relativ konstant. Aber im Vergleich zum Patient 3 hatte der Patient 4 einen gut nachweisbaren CD16-Titer. Außerdem hatte Patient 4 nach Tag 300 post-PBSCT einen NT-Ak-Anstieg, was auch mit der Hemmung der Virämie korreliert.

Beschreibt man die postvirämische Phase (Patienten 7-12), muss man folgende Beobachtungen hervorheben. Es wurde vorausgesetzt, dass die Abwesenheit der Virämie ursächlich auf einer gesteigerten Antikörperbildung und immunologischen Rekonstitution beruht. Alle Patienten in dieser Phase zeigten einen allgemeinen Trend einer gesteigerten CMV-Antikörperbildung. Diese Ähnlichkeit wurde nicht nur bei Patienten in der früheren postvirämischen Phase (7, 8, 9), sondern auch bei den Patienten in der späten postvirämischen Phase (11, 12) gezeigt. Es war auch auffällig, dass alle Antikörperkinetiken während der späten Beobachtungsperiode keine starken Titeranstiege mehr gezeigt haben. Dabei muss erwähnt werden, dass die Patienten in der früheren Zeit nach der Transplantation (7, 8, 9) im Vergleich zu den Patienten in der späteren Posttransplantationszeit in der Antikörperbildungskinetik instabiler waren; es wurden nicht nur Titerabweichungen, sondern auch ein sehr zögerlicher ELISA-Titeranstieg nachgewiesen (Patient 9). Man könnte deshalb die Hypothese aufstellen, dass kurz nach der HCMV-Virämie eine Boosterung der Antikörperbildung erfolgt (Restimulation?).

Ausgehend davon kann man feststellen, dass eine erfolgreiche Rekonstitution zu der Stabilisierung bzw. Steigerung der Antikörperproduktion führt. Obwohl die Antikörperbildung bei einigen Patienten mit der Kontrollgruppe vergleichbar wird, bleiben die ELISA-Werte jedoch auf dem höheren Niveau.

Diskutiert man die Reaktivierungswahrscheinlichkeit nach der Transplantation und die Zugehörigkeit zu der Hoch – bzw. Niedrigrisikogruppe, kann man in unserem Kollektiv feststellen, dass unabhängig von der Risikokonstellation alle Patienten längere oder kürzere Virämieepisoden entwickelt haben.

5.2.3 Korrelation der Antikörperbildung mit Lymphozytenzahlen

Für manche Patienten waren durchflusszytometrisch bestimmte Zahlen der Lymphozytensubpopulationen verfügbar, so dass man den Antikörpertiter, die Virämie und den Stand der immunkompetenten Zellen vergleichen konnte. Man konnte dabei feststellen, dass in der früheren Zeit nach der Transplantation (Patient 1) eine Verminderung der Zahl von fast allen immunkompetenten Zellen nachgewiesen wurde. Der CMV-CD16, NT-Antikörpertiter und die normale Zahl von CD4⁺-Lymphozyten waren zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichend, um die Virämie zu vermeiden. Bei Patient 5 wurde eine relativ gute Rekonstitution der immunkompetenten Zellen nachgewiesen, allerdings waren nur die CD4⁺-Lymphozyten deutlich unter den Normalwerten. Die CMV-IgG waren gering, was für eine wesentliche Rolle der T-Zellhilfe bei der funktionellen Rekonstitution der B-Zellfunktion spricht (Smith et al., 2000; Zhou et al., 2009). Patient 6 wurde zweimal Lymphozytensubpopulationen untersucht: Kurz vor der letzten nachgewiesenen Virämie und während einer nichtvirämischen Periode. Man kann in diesem Fall postulieren, dass eine Vermehrung von NK-Zellen, die von einem hohen Antikörpertiter begleitet wurde, mit der Kontrolle der Virämie korreliert, obgleich eine Rekonstitution der CD4⁺Lymphozytenzahl noch nicht erreicht war. Die Virämiehemmung könnte in diesem Fall mit der Kombination der rekonstituierten Zellantwort (NK-Zellen) und Anwesenheiten der CD-16 aktivierenden Antikörper erklärt werden, was auch im Tiermodell gezeigt wurde (Manischewitz and Quinnan, 1980). Im Vergleich zum Patient 5, bei dem eine schwache Antikörperbildung mit der geringen Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten zu tun haben könnte, scheint die Antikörperbildung beim Patient 6 von CD4⁺-Hilfe unabhängig zu sein, was auch den publizierten Daten übereinstimmt (Hebeis et al., 2004; Klenovsek et al., 2007).

Eine interessante Tendenz wurde auch bei den Patienten in verschiedenen postvirämischen Perioden beobachtet. Patientin 7 wies eine ausgeprägte absolute Lymphozytose auf. Mehrere Lymphozytensubpopulationen befanden sich über den Normalwerten, wobei diese Tendenz relativ lange beibehalten wurde (Tag 424-718 nach PBSCT). Was auch auffällig war, dass trotz der langen Zeit nach PBSCT eine Verminderung der CD4⁺-Lymphozyten neben der CD8⁺-Lymphozytose nachgewiesen wurde (Patienten 8, 9). Vermutlich steht die erfolgreiche Kontrolle der HCMV-Reaktivierung mit der Anwesenheit der CD8⁺-Lymphozyten im Zusammenhang

(Cwynarski et al., 2001; Cobbold et al., 2005; Bunde et al., 2005). Es ist also festzustellen, dass die unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen scheinbar mit unterschiedlicher Kinetik rekonstituiert werden.

5.3 Immunglobulinpräparationen als Quelle von therapeutischen CMV-Antikörpern

Die Verwendung von IVIG wird mit dem Ziel der Prävention einer möglichen CMV-Erkrankung nach Transplantationen bereits angewandt (Nigro et al., 2005). Wie oben gezeigt wurde, hängen Neutralisationstiter und Titer der zytotoxischen Antikörper von den Präparaten ab. Aus den oben gezeigten Daten kann man schließen, dass der Antikörpertiter trotz mehrmaligen Gamunex®-Gabe auf dem relativ niedrigen Niveau verbleibt (siehe Abb. 15, Patient 5). Ausgehend davon kann man weiter schlussfolgern, dass der hohe CD16-Titer, der bei den Patienten 1, 2 und 6 nachgewiesen wurde, nicht durch die Gamunex®-Transfusionen zu erklären ist, sondern vom Patienten gebildet wurde.

Darüber hinaus korreliert die Verwendung dieser Präparationen auch nicht mit der Virämie: Trotz der Infusionen kann man zu den entsprechenden Zeitpunkten Virämien beobachten. Die Daten dieser Studie zeigen eine Wirksamkeit der von den Patienten selbst gebildeten Antikörper bei der Hemmung der HCMV-Virämie (Patienten 1, 2, 6). Diese Diskrepanz kann folgende Erklärung haben. Einige Autoren berufen sich auf den Fakt, dass die Probandenauswahl für die Blutspende mittels des ELISA-Antikörpernachweisverfahrens erfolgt und dass es nicht zwangsläufig eine eindeutige Korrelation zwischen dem ELISA-Titer und dem Neutralisationstiter gibt, was z.B. zu einer klinischen Ineffektivität der Präparationen führen kann (Kropff et al., 1993). Die Autoren haben auch demonstriert, dass die Antikörper, die zielgerichtet gegen bestimmten in dem Neutralisationsprozess relevanten Proteine rausgesucht und selektioniert wurden, bessere neutralisierende bzw. antivirale Kapazitäten gezeigt haben, was auch in nachfolgenden klinischen Untersuchungen bei transplantierten Patienten bewiesen wurde (Kropff et al., 1993). Man kann also mit diesem Nachweisprinzip scheinbar keine funktionell effizienten Antikörper für die Virusneutralisation und/oder ADCC nachweisen.

Eine Bedingung, aufgrund derer die Spender für die Immunglobulinpräparationen ausgewählt werden, ist ein bestimmter Titer der anti-HCMV-Antikörper (anti-HCMV-IgG), d.h. dass für die Spende nur die Donoren mit einem relativ hohen Titer ausgewählt werden. Ausgehend von den in der Studie erhaltenen Daten sowie in der Literatur gezeigten Daten könnte man sich vorstellen, dass die Spender, die mittels eines verfügbaren ELISA-Systems untersucht wurden und einen ähnlichen ELISA-Titer haben, unterschiedliche Titer der CD16-aktivierenden Antikörper haben. Da es dabei nicht bekannt ist, wie groß der prozentuale Teil der Spender mit einem hohen CD16-

Titer im Präparat war und das Kontingent der potenziellen Spender nicht immer gleich ist, kann man theoretisch erwarten, dass auch der Präparat trotz seiner Ähnlichkeit hinsichtlich des ELISA-Titers unterschiedliche CD16- und NT-Titer haben kann. Berücksichtigt man auch eine Variabilität zwischen verschiedenen kommerziellen Präparationen, kann man sich vorstellen, warum die Verwendung von den IgG-Präparationen trotz der existierenden Evidenz der Antikörpereffizienz bis jetzt keine wesentliche Rolle in der Behandlung der Infektionskomplikationen nach der Transplantation spielt.

Zurzeit existierende Daten lassen vermuten, dass die Immunantwort gegen HCMV bei transplantierten Patienten ein komplexes Phänomen ist. Aufgrund der Daten wäre es unkorrekt zu denken, dass nur bestimmte Komponenten des Immunsystems eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HCMV-Infektion spielen können. Eine „ideale“ Immunkontrolle der HCMV-Infektion wird offensichtlich nur durch gut ausbalancierte Komponenten des Immunsystems gewährleistet. Einige der oben genannten Referenzen haben gezeigt, dass einerseits die Abwesenheit einzelner Komponente des Immunsystems die CMV-Kontrolle nicht sonderlich stark beeinflussen kann (Jonjic et al., 1990), andererseits, dass die Anwesenheit nur einer Komponente des Immunsystems eine wesentliche Rolle bei der CMV-Infektion spielen kann (Klenovsek et al., 2007). So wird ein bekanntes Postulat über die Redundanz der Immunkontrolle von CMV bestätigt. Darüber hinaus kann man schlussfolgern, dass im Falle der CMV-Kontrolle noch ein sehr wichtiges, allgemeines biologisches Phänomen vorhanden ist. Das ist so genannte Prinzip der funktionellen Duplikation: In akuten, kritischen Situationen können die verbleibenden Komponenten eines Systems die entfallenen Funktionen der beschädigten Komponenten übernehmen.

5.4 Perspektiven

Die demonstrierte Evidenz für eine wichtige Rolle der Antikörper in den verschiedenen Phasen der HCMV-Infektion im *in vivo*-Modell (Manischewitz and Quinnan, 1980; Shanley et al., 1981; Rapp et al., 1993; Jonjic et al., 1994; Reddehase et al., 1994) zusammen mit der unter klinischer Bedingungen nachgewiesenen Antikörperineffizienz (Sokos et al., 2002; Cordonnier et al., 2003; Raanani et al., 2009) erfordert weitere Untersuchungen im Bereich der Verbesserung der Antikörpernachweisverfahren sowie der Herstellung klinisch effektiver IVIG-Präparate.

Die oben gezeigten Daten reflektieren jedoch eine hohe Plastizität der Rolle der Antikörper in der HCMV-Infektion. Darüber hinaus werden die Patienten üblicherweise nach Transplantationen auch mit anderen Medikamenten behandelt, die auch antivirale Effekte haben, was

möglicherweise zu einer Maskierung der Antikörpereffekte führt und somit die Analyse der klinischen Effizienz von Antikörpern erschwert.

Um die Frage der Rolle der Antikörper zu analysieren und zu beantworten, könnte man weitere Untersuchungen vornehmen, in denen folgende Momente berücksichtigt werden:

- Man könnte eine Gruppe von Patienten bilden, die gegenüber den zurzeit in der Klinik verwendeten anti-HCMV Virostatika allergische Reaktionen entwickeln und so nicht mit selbigen behandelt werden können. Eine Untersuchung der Patienten, bei denen HCMV Mono – oder Multiresistenzen gegenüber Virostatika entwickelt hat, könnte auch perspektivisch sein. Die beiden Konditionen wären dann eine mögliche Indikation zur Verabreichung einer IVIG-Präparation.
- Eine Reihe der zurzeit auf dem Markt verfügbaren IVIG-Präparate sollte mittels des neuen Antikörpernachweisverfahrens getestet werden, um die Menge der den Patienten verabreichten Antikörper bestimmen zu können und nach der Verabreichung im Zeitverlauf zu dokumentieren. Ausgehend davon, dass die zurzeit verwendeten Immunglobulinpräparationen keine eindeutige klinische und biologische Effizienz bei der Hemmung der HCMV-Virämie zeigen, könnte man versuchen, eine Präparation mit einem sehr hohen Titer an CD16-aktivierenden Antikörpern herzustellen und nach der Transplantation zu verabreichen. Die Spenderauswahl könnte in diesem Fall mittels des neuen Testverfahrens durchgeführt werden. Ein Vergleich der mittels dieses Verfahrens analysierten Immunglobulinpräparate mit den üblichen verfügbaren IVIGs sowie mit einem Placebo mit der nachfolgenden Dokumentierung des Antikörpertiters und seiner Korrelation mit dem Dauer und der Ausprägung der Virämie, könnte die Rolle der Antikörper während einer Reaktivierung vermutlich präzisieren.
- Eine andere Richtung in der klinischen Forschung könnte eine selektive Verwendung von den immunologisch modifizierten, gegen bestimmten viralen Infektionen orientierten Zellen sein (Einsele et al., 2002; Rauser et al., 2004; Cobbold et al., 2005; Clemenceau et al., 2006; Klenovsek et al., 2007). In der frühen Phase nach der Transplantation, wenn die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung besonders groß ist und der Patient noch keine neuen immunkompetenten Zellen hat, könnte dies vermutlich eine wesentliche Rolle in der Prävention einer HCMV-Reaktivierung spielen.

Die Herstellung von Immunglobulinpräparaten, die funktionell aktive Antikörperfraktionen enthalten und nach der Verabreichung einen therapeutisch effektiven, reaktivierungshemmenden Titer im Blut erreichen können, wird vermutlich zur Verbesserung der Therapieoptionen und zur

Verminderung der Letalität von der HCMV-Erkrankung nach der PBSCT führen. Um die oben gestellten Fragen zu beantworten, sind jedoch weitere prospektive Studien erforderlich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV) stellt wegen der hohen Durchseuchung, der lebenslangen Persistenz sowie den lebensbedrohlichen Komplikationen unter Immunsuppression eine klinisch wichtige Infektion dar. Die Immunantwort gegen HCMV ist hierarchisch und redundant organisiert und wird durch ein Zusammenspiel des zellulären und des humoralen Teils des Immunsystems wirksam. Es wurde u. a. im Mausmodell gezeigt, dass Virus-neutralisierende und zytotoxische Antikörper bei der CMV-Kontrolle eine wichtige Rolle spielen. Die Datenlage bei vergleichbaren Situationen beim Menschen ist nicht konsistent, etwa bei verschiedenen klinischen Anwendungen von HCMV-(Hyper)Immunglobulinpräparaten bei aktiven HCMV-Infektionen.

Um die Rolle von Antikörpern besser zu verstehen und Hypothesen für eine weitere prospektive Studie zu generieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kohorte von HCMV-seropositiven hämatologischen Patienten nach PBSCT retrospektiv untersucht. Es wurden verschiedene HCMV-Antikörpersubfraktionen mit unterschiedlichen immunologischen Effektor-Funktionen und deren Wirkung auf die Kinetik einer HCMV-Virämie untersucht. Die Bestimmungen der jeweiligen Antikörpertiter wurden mittels CMV-spezifischem IgG-ELISA, per Neutralisationstests (Nachweis der neutralisierenden Ak) und mit einem neuartigen Fc γ -Rezeptoraktivierungs-Testverfahren (Nachweis der CD16-aktivierenden resp. zytotoxischen Ak), der in der Arbeitsgruppe neu etabliert worden ist, durchgeführt. Eine Virämie wurde mittels PCR-Nachweis der HCMV DNA-Genomkopien nachgewiesen, die Lymphozytensubpopulationen wurden per Durchflußzytometrie gemessen.

Alle untersuchten Patienten zeigten in der Posttransplantationsphase Phasen einer HCMV-Virämie. Interessanterweise korrelierte die Antikörperbildung in 50% der Patienten (insbesondere in der frühen Posttransplantationsphase) mit der Rückbildung der HCMV-Virämie. Bei einem der Patienten wurde beobachtet, dass ein Zusammenspiel der rekonstituierten NK-Zellen und der CD16-aktivierenden Antikörper zur Hemmung einer HCMV-Virämie führte. Es konnte jedoch keine direkte Korrelation zwischen der globalen HCMV-reaktiven IgG-Menge (nachgewiesen durch ELISA) und der Menge der CD16-aktivierenden Antikörper nachgewiesen werden, da bei einigen Patienten trotz nachweisbarer ELISA-Titer keine CD16-aktivierenden Antikörper gefunden wurden.

In der späten Posttransplantationsphase wurde für alle HCMV-Antikörper die Tendenz festgestellt, sich allmählich auf konstantem Niveau einzupendeln. Bei den Patienten der frühen Phase wurde dieser Trend noch nicht beobachtet. Die Kinetik der CD16-aktivierenden Antikörper und der neutralisierenden Antikörper erreichten bei den Patienten in der späten Posttransplantationsphase allmählich das Niveau der Kontrollgruppe. Interessanterweise wurde dies nicht für die globale HCMV-IgG-Antikörpermenge (ELISA-reaktiv) beobachtet.

Schlussfolgerung: Es konnten distinkte Funktionsklassen von HCMV-reaktiven Antikörpern nachgewiesen werden. Hierbei wurde die Klasse der CD16-aktivierenden IgG-Klasse erstmalig für eine klinisch relevante Patientenkohorte über einen längeren Zeitraum untersucht. Die partielle, inverse Korrelation des Anstiegs der Antikörpermenge mit der Beendigung der HCMV-Virämie lässt vermuten, dass diese Klasse von Antikörpern eine eminente Rolle in der Kontrolle von HCMV bei PBSCT-Patienten spielt.

7 LITERATUR

1. Abraham,O.C., Klein,J., Chalasani,G., Cassells,L., Dansey,R., Abella,S., Karaness,C., Peters,W., Baynes,R., and Chandrasekar,P.H. (1998). Infectious complications in women undergoing autologous peripheral blood progenitor cell transplantation (PBPCT) for breast cancer. *Blood* 92, 320B.
2. Aderem,A. and Underhill,D.M. (1999). MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. *Annual Review of Immunology* 17, 593-623.
3. Adler,S.P. (1985). The Molecular Epidemiology of Cytomegalo-Virus Transmission Among Children Attending A Day-Care Center. *Journal of Infectious Diseases* 152, 760-768.
4. Alford,C.A., Stagno,S., Pass,R.F., and Huang,E.S. (1981). Epidemiology of cytomegalovirus. In *The Human Herpesviruses. In The Human Herpesviruses: An Interdisciplinary Perspective* 159-171.
5. Allen,J.M. and Seed,B. (1989). Isolation and Expression of Functional High-Affinity Fc Receptor Complementary Dnas. *Science* 243, 378-381.
6. Amigorena,S., Salamero,J., Davoust,J., Fridman,W.H., and Bonnerot,C. (1992). Tyrosine-Containing Motif That Transduces Cell Activation Signals Also Determines Internalization and Antigen Presentation Via Type-Iii Receptors for Igg. *Nature* 358, 337-341.
7. Baden,L. and Rubin,R.H. (2004). Infection in the Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient. In *Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies*, (Totowa, New Jersey: Humana Press), p. 248.
8. Ben Salah,H., Coze,C., Gentet,J.C., Lautraite,C., Andre,N., and Bernard,J.L. (2005). Infectious complications postengraftment in the first year after autologous stem cell transplantation in children. *Archives de Pediatrie* 12, 526-532.
9. Biron,C.A., Nguyen,K.B., Pien,G.C., Cousens,L.P., and Salazar-Mather,T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* 17, 189-220.
10. Bitmansour,A.D., Douek,D.C., Maino,V.C., and Picker,L.J. (2002). Direct ex vivo analysis of human CD4(+) memory T cell activation requirements at the single clonotype level. *Journal of Immunology* 169, 1207-1218.
11. Boeckh,M., Bowden,R.A., Storer,B., Chao,N.J., Spielberger,R., Tierney,D.K., Gallez-Hawkins,G., Cunningham,T., Blume,K.G., Levitt,D., and Zaia,J.A. (2001). Randomized, placebo-controlled, double-blind study of a cytomegalovirus-specific monoclonal antibody (MSL-109) for prevention of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 7, 343-351.

12. Bolovan-Fritts,C.A., Mocarski,E.S., and Wiedeman,J.A. (1999). Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* 93, 394-398.
13. Boppana,S.B., Rivera,L.B., Fowler,K.B., Mach,M., and Britt,W.J. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *New England Journal of Medicine* 344, 1366-1371.
14. Bortin,M.M., Horowitz,M.M., and Rimm,A.A. (1992). Increasing Utilization of Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Results of the 1988-1990 Survey. *Ann Intern Med* 116, 505-512.
15. Borysiewicz,L.K., Morris,S., Page,J.D., and Sissons,J.G.P. (1983). Human Cytomegalovirus-Specific Cyto-Toxic Lymphocytes-T - Requirements for Invitro Generation and Specificity. *European Journal of Immunology* 13, 804-809.
16. Bowden,R.A. (1995). Transfusion-Transmitted Cytomegalovirus-Infection. *Hematology-Oncology Clinics of North America* 9, 155-&.
17. Bowden,R.A., Slichter,S.J., Sayers,M.H., Mori,M., Cays,M.J., and Meyers,J.D. (1991). Use of Leukocyte-Depleted Platelets and Cytomegalovirus-Seronegative Red-Blood-Cells for Prevention of Primary Cytomegalovirus-Infection After Marrow Transplant. *Blood* 78, 246-250.
18. Brady,M.T., Milam,J.D., Anderson,D.C., Hawkins,E.P., Speer,M.E., Seavy,D., Bijou,H., and Yow,M.D. (1984). Use of Deglycerolized Red-Blood-Cells to Prevent Posttransfusion Infection with Cytomegalovirus in Neonates. *Journal of Infectious Diseases* 150, 334-339.
19. Britt,W. (2007). Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. In *Human Herpesviruses. Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.*, Cambridge University Press), pp. 741-742.
20. Brunstein,C.G., Baker,K.S., and Wagner,J.E. (2007). Umbilical cord blood transplantation for myeloid malignancies. *Current Opinion in Hematology* 14, 162-169.
21. Bryant,P., Morley,C., Garland,S., and Curtis,N. (2002). Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies: does it matter? *Archives of Disease in Childhood* 87, F75-F77.
22. Buchholz,S. and Ganser,A. (2009). Hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Internist* 50, 572-580.
23. Bukowski,J.F., Woda,B.A., and Welsh,R.M. (1984). Pathogenesis of Murine Cytomegalovirus-Infection in Natural-Killer Cell-Depleted Mice. *J. Virol.* 52, 119-128.
24. Bunde,T., Kirchner,A., Hoffmeister,B., Habedank,D., Hetzer,R., Cherepnev,G., Proesch,S., Reinke,P., Volk,H.D., Lehmkuhl,H., and Kern,F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 201, 1031-1036.
25. Caligiuri,M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* 112, 461-469.

26. Chern,K.C., Chandler,D.B., Martin,D.F., Kuppermann,D.B., Wolitz,R.A., and Margolis,T.P. (1998). Glycoprotein B subtyping of cytomegalovirus (CMV) in the vitreous of patients with AIDS and CMV retinitis. *Journal of Infectious Diseases* 178, 1149-1153.
27. Chou,S.W. (1986). Acquisition of Donor Strains of Cytomegalovirus by Renal-Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine* 314, 1418-1423.
28. Chou,S.W. (1987). Cytomegalovirus-Infection and Reinfection Transmitted by Heart-Transplantation. *Journal of Infectious Diseases* 155, 1054-1056.
29. Clemenceau,B., Congy-Jolivet,N., Gallot,G., Vivien,R., Gaschet,J., Thibault,G., and Vie,H. (2006). Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood* 107, 4669-4677.
30. Clemenceau,B., Vivien,R., Berthome,M., Robillard,N., Garand,R., Gallot,G., Vollant,S., and Vie,H. (2008). Effector memory alpha beta T lymphocytes can express Fc gamma RIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Immunology* 180, 5327-5334.
31. Cobbold,M., Khan,N., Pourgheysari,B., Tauro,S., McDonald,D., Osman,H., Assenmacher,M., Billingham,L., Steward,C., Crawley,C., Olavarria,E., Goldman,J., Chakraverty,R., Mahendra,P., Craddock,C., and Moss,P.A.H. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp. Med.* 202, 379-386.
32. Cole and Kuttner (1926). A filtrable virus present in the submaxillary glands of guinea pigs. *J. Exp. Med.* 44, 855-873.
33. Copelan,E.A. (2006). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 354, 1813-1826.
34. Cordonnier,C., Chevret,S., Legrand,M., Rafi,H., Dhedin,N., Lehmann,B., Bassompierre,F., Gluckman,E., and for the GREFIG Study Group* (2003). Should Immunoglobulin Therapy Be Used in Allogeneic Stem-Cell Transplantation? A Randomized, Double-Blind, Dose Effect, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *Ann Intern Med* 139, 8-18.
35. Corrales-Aguilar,E. (2008). A Novel Method for Measuring IgG-Dependent Triggering of Host FcγRs CD16, CD32 and CD64 Reveals a Selective Inhibition through Herpesviral FcγRs. Dissertation.
36. Cwynarski,K., Ainsworth,J., Cobbold,M., Wagner,S., Mahendra,P., Apperley,J., Goldman,J., Craddock,C., and Moss,P.A.H. (2001). Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 97, 1232-1240.
37. Daeron,M., Malbec,O., Bonnerot,C., Latour,S., Segal,D.M., and Fridman,W.H. (1994). Tyrosine-Containing Activation Motif-Dependent Phagocytosis in Mast-Cells. *Journal of Immunology* 152, 783-792.

38. de Mello,A., Ferreira,E.C., Vilas Boas,L.S., and Pannuti,C.S. (1996). Cytomegalovirus infection in a day-care center in the municipality of Sao Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38, 165-169.
39. Drew,W.L., Sweet,E.S., Miner,R.C., and Mocarski,E.S. (1984). Multiple Infections by Cytomegalovirus in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome - Documentation by Southern Blot Hybridization. *Journal of Infectious Diseases* 150, 952-953.
40. Dworsky,M., Yow,M., Stagno,S., Pass,R.F., and Alford,C. (1983). Cytomegalovirus-Infection of Breast-Milk and Transmission in Infancy. *Pediatrics* 72, 295-299.
41. Edberg,J.C. and Kimberly,R.P. (1994). Modulation of Fc-Gamma and Complement Receptor Function by the Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Form of Fc-Gamma-Riii. *Journal of Immunology* 152, 5826-5835.
42. Edberg,J.C., Salmon,J.E., and Kimberly,R.P. (1992). Functional-Capacity of Fc-Gamma Receptor-Iii (Cd16) on Human Neutrophils. *Immunologic Research* 11, 239-251.
43. Einsele,H., Roosnek,E., Rufer,N., Sinzger,C., Riegler,S., Loffler,J., Grigoleit,U., Moris,A., Rammensee,H.G., Kanz,L., Kleihauer,A., Frank,F., Jahn,G., and Hebart,H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-3922.
44. Elkington,R., Walker,S., Crough,T., Menzies,M., Tellam,J., Bharadwaj,M., and Khanna,R. (2003). Ex vivo profiling of CD8(+)-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J. Virol.* 77, 5226-5240.
45. Fanger,N.A., Wardwell,K., Shen,L., Tedder,T.F., and Guyre,P.M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157, 541-548.
46. Farrell,H.E. and Shellam,G.R. (1991). Protection Against Murine Cytomegalovirus-Infection by Passive Transfer of Neutralizing and Nonneutralizing Monoclonal-Antibodies. *Journal of General Virology* 72, 149-156.
47. Filipovich,A.H., Peltier,M.H., Bechtel,M.K., Dirksen,C.L., Strauss,S.A., and Englund,J.A. (1992). Circulating Cytomegalovirus (Cmv) Neutralizing Activity in Bone-Marrow Transplant Recipients - Comparison of Passive-Immunity in A Randomized Study of 4 Intravenous Igg Products Administered to Cmv-Seronegative Patients. *Blood* 80, 2656-2660.
48. Gessner,J.E., Heiken,H., Tamm,A., and Schmidt,R.E. (1998). The IgG Fc receptor family. *Annals of Hematology* 76, 231-248.
49. Goerner,M., Wandt,H., Schafer-Eckart,K., Birkmann,J., Denzel,T., and Gallmeier,W.M. (1999). The use of CD34(+)-selected PBPC after high-dose chemotherapy in breast cancer patients is associated with prolonged recovery time and increased infectious complications. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 8, 387-391.
50. Gold and Nankervis (1982). Cytomegalovirus. In *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control* 167-186.

51. Goodpasture,E.W. and Talbot,F.B. (1921). CONCERNING THE NATURE OF "PROTOZOAN-LIKE" CELLS IN CERTAIN LESIONS OF INFANCY. *Am J Dis Child* 21, 415-425.
52. Goodrum,F.D., Jordan,C.T., High,K., and Shenk,T. (2002). Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: A model for latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16255-16260.
53. Gottschalk,L.R., Bray,R.A., Kaizer,H., and Gebel,H.M. (1990). 2 Populations of Cd56 (Leu-19)+/Cd16+ Cells in Bone-Marrow Transplant Recipients. *Bone Marrow Transplantation* 5, 259-264.
54. Grundy,J.E., Super,M., Sweny,P., Moorhead,J., Lui,S.F., Berry,N.J., Fernando,O.N., and Griffiths,P.D. (1988). Symptomatic Cytomegalo-Virus Infection in Seropositive Kidney Recipients - Reinfection with Donor Virus Rather Than Reactivation of Recipient Virus. *Lancet* 2, 132-135.
55. Hahn,G., Jores,R., and Mocarski,E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3937-3942.
56. Hebeis,B.J., Klenovsek,K., Rohwer,P., Ritter,U., Schneider,A., Mach,M., and Winkler,T.H. (2004). Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help. *Journal of Experimental Medicine* 199, 593-602.
57. Hecker,M., Qiu,D., Marquardt,K., Bein,G., and Hackstein,H. (2004). Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sanguinis* 86, 41-44.
58. Hengel,H., Brune,W., and Koszinowski,U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus - survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends in Microbiology* 6, 190-197.
59. Holswade,G.R., Engle,M.A., Redo,S.F., Goldsmith,E.I., and Barondess,J.A. (1963). Development of Viral Diseases and A Viral Diseases-Like Syndrome After Extracorporeal Circulation. *Circulation* 27, 812-&.
60. Hulett,M.D. and Hogarth,P.M. (1994). Molecular-Basis of Fc Receptor Function. *Advances in Immunology*, Vol 57 57, 1-127.
61. Hutto,C., Ricks,R., Garvie,M., and Pass,R.F. (1985). Epidemiology of Cytomegalo-Virus Infections in Young-Children - Day-Care Vs Home Care. *Pediatric Infectious Disease Journal* 4, 149-152.
62. Iversen,A.C., Norris,P.S., Ware,C.F., and Benedict,C.A. (2005). Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *Journal of Immunology* 175, 7568-7574.
63. Jacobs,R., Stoll,M., Stratmann,G., Leo,R., Link,H., and Schmidt,R.E. (1992). Cd16-Cd56+ Natural-Killer-Cells After Bone-Marrow Transplantation. *Blood* 79, 3239-3244.

64. Jesionek and Kiolemenoglou (1904). Uber einen befund von protozoenartigen gebilden in den organen eines heriditarluetischen fotus. *Munch. Med. Wochenschr* 51, 1905-1907.
65. Jonjic,S., Pavic,I., Lucin,P., Rukavina,D., and Koszinowski,U.H. (1990). Efficacious Control of Cytomegalovirus-Infection After Long-Term Depletion of Cd8+ Lymphocytes-T. *J. Virol.* 64, 5457-5464.
66. Jonjic,S., Pavic,I., Polic,B., Crnkovic,I., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1994). Antibodies Are Not Essential for the Resolution of Primary Cytomegalovirus-Infection But Limit Dissemination of Recurrent Virus. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1713-1717.
67. Kakiuchi,T., Chesnut,R.W., and Grey,H.M. (1983). B-Cells As Antigen-Presenting Cells - the Requirement for B-Cell Activation. *Journal of Immunology* 131, 109-114.
68. Karre,K. (2002). NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self. *Scandinavian Journal of Immunology* 55, 221-228.
69. Karre,K. (2008). Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 9, 477-480.
70. Kelsey,S.M., Lowdell,M.W., and Newland,A.C. (1990). Igg Subclass Levels and Immune Reconstitution After T-Cell-Depleted Allogeneic Bone-Marrow Transplantation. *Clinical and Experimental Immunology* 80, 409-412.
71. Kern,F., Bunde,T., Faulhaber,N., Kiecker,F., Khatamzas,E., Rudawski,I.M., Pruss,A., Gratama,J.W., Volkmer-Engert,R., Ewert,R., Reinke,P., Volk,H.D., and Picker,L.J. (2002). Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *Journal of Infectious Diseases* 185, 1709-1716.
72. Klenovsek,K., Weisel,F., Schneider,A., Appelt,U., Jonjic,S., Messerle,M., Bradel-Tretheway,B., Winkler,T.H., and Mach,M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* 110, 3472-3479.
73. Kondo,K., Kaneshima,H., and Mocarski,E.S. (1994). Human Cytomegalovirus Latent Infection of Granulocyte-Macrophage Progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11879-11883.
74. Kondo,K., Xu,J.K., and Mocarski,E.S. (1996). Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11137-11142.
75. Krech,U. and Tobin,J. (1981). A Collaborative Study of Cytomegalovirus Antibodies in Mothers and Young-Children in 19 Countries. *Bulletin of the World Health Organization* 59, 605-610.
76. Kropff,B., Landini,M.P., and Mach,M. (1993). An Elisa Using Recombinant Proteins for the Detection of Neutralizing Antibodies Against Human Cytomegalovirus. *Journal of Medical Virology* 39, 187-195.
77. Lequin,R.M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem* 51, 2415-2418.

78. Lilleri,D., Fornara,C., Chiesa,A., Caldera,D., Alessandrino,E.P., and Gerna,G. (2008). Human cytomegalovirus-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica-the Hematology Journal* 93, 248-256.
79. Ljungman,P., Larsson,K., Kumlien,G., Aschan,J., Barkholt,L., Gustaffson-Jernberg,A., Lewensohn-Fuchs,I., and Ringden,O. (2002). Leukocyte depleted, unscreened blood products give a low risk for CMV infection and disease in CMV seronegative allogeneic stem cell transplant recipients with seronegative stem cell donors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 34, 347-350.
80. Mach,M. (2006). Antibody-mediated Neutralization of Infectivity. In *Cytomegaloviruses. Biology and Immunology*, Caister Academic Press), p. 279.
81. Maciejewski,J.P., Bruening,E.E., Donahue,R.E., Mocarski,E.S., Young,N.S., and Stjeor,S.C. (1992). Infection of Hematopoietic Progenitor Cells by Human Cytomegalovirus. *Blood* 80, 170-178.
82. Maeda,S., Kagami,Y., Ogura,M., Taji,H., Suzuki,R., Kondo,E., Asakura,S., Takeuchi,T., Miura,K., Ando,M., Nakamura,S., Ito,T., Kinoshita,T., Ueda,R., and Morishima,Y. (2001). CD34(+)-selected autologous peripheral blood stem cell transplantation conditioned with total body irradiation for malignant lymphoma: Increased risk of infectious complications. *International Journal of Hematology* 74, 214-221.
83. Malynn,B.A. and Wortis,H.H. (1984). Role of Antigen-Specific B-Cells in the Induction of Srbc-Specific T-Cell Proliferation. *Journal of Immunology* 132, 2253-2258.
84. Manischewitz,J.E. and Quinnan,G.V. (1980). Antivirus Antibody-Dependent Cell-Mediated Cyto-Toxicity During Murine Cytomegalovirus-Infection. *Infection and Immunity* 29, 1050-1054.
85. Matthes-Martin,S., Lion,T., Aberle,S.W., Fritsch,G., Lawitschka,A., Bittner,B., Frommlet,F., Gadner,H., and Peters,C. (2002). Pre-emptive treatment of CMV DNAemia in paediatric stem cell transplantation: the impact of recipient and donor CMV serostatus on the incidence of CMV disease and CMV-related mortality. *Bone Marrow Transplant* 31, 803-808.
86. Mclaughlintaylor,E., Pande,H., Forman,S.J., Tanamachi,B., Li,C.R., Zaia,J.A., Greenberg,P.D., and Riddell,S.R. (1994). Identification of the Major Late Human Cytomegalovirus Matrix Protein Pp65 As A Target Antigen for Cd8(+) Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes. *Journal of Medical Virology* 43, 103-110.
87. Mendelson,M., Monard,S., Sissons,P., and Sinclair,J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34(+) bone marrow progenitors. *Journal of General Virology* 77, 3099-3102.
88. Mertens,T., Haller,O., and Klenk,H.-D. (2004). Zytomegalievirus (CMV). In *Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten*, ELSEVIER Urban&Fischer), pp. 303-310.
89. Minton,E.J., Tysoe,C., Sinclair,J.H., and Sissons,J.G.P. (1994). Human Cytomegalovirus-Infection of the Monocyte/Macrophage Lineage in Bone-Marrow. *J. Virol.* 68, 4017-4021.

90. Moiseev,S., Nuiia,M., Chebotkevich,V., Gonchar,V., and Abdulkadyrov,K. (2002). Cytomegalovirus infection in bone marrow transplantation. *Ter Arkh.* 74, 44-48.
91. Movassagh,M., Gozlan,J., Senechal,B., Baillou,C., Petit,J.C., and Lemoine,F.M. (1996). Direct infection of CD34(+) progenitor cells by human cytomegalovirus: Evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood* 88, 1277-1283.
92. Nagarajan,S., Chesla,S., Cobern,L., Anderson,P., Zhu,C., and Selvaraj,P. (1995). Ligand-Binding and Phagocytosis by Cd16 (Fc-Gamma Receptor-Iii) Isoforms - Phagocytic Signaling by Associated Zeta-Subunits and Gamma-Subunits in Chinese-Hamster Ovary Cells. *Journal of Biological Chemistry* 270, 25762-25770.
93. Natali,A., Valcavi,P., Medici,M.C., Dieci,E., Montali,S., and Chezzi,C. (1997). Cytomegalovirus infection in an Italian population: Antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission. *Microbiologica* 20, 123-133.
94. Nigro,G., Adler,S.P., La Torre,R., Best,A.M., and the Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group (2005). Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med* 353, 1350-1362.
95. Noel,D.R., Witherspoon,R.P., Storb,R., Atkinson,K., Doney,K., Mickelson,E.M., Ochs,H.D., Warren,R.P., Weiden,P.L., and Thomas,E.D. (1978). Does Graft Versus Host Disease Influence Tempo of Immunological Recovery After Allogeneic Human Marrow Transplantation - Observation on 56 Long-Term Survivors. *Blood* 51, 1087-1105.
96. Paloheimo JA, von Essen R, Klemola E, Kääriäinen L, and Siltanen P (1968). Subclinical cytomegalovirus infections and cytomegalovirus mononucleosis after open heart surgery. *American Journal of Cardiology* 22, 624-630.
97. Pass,R.F., Stagno,S., Myers,G.J., and Alford,C.A. (1980). Outcome of Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection: Results of Long-Term Longitudinal Follow-up. *Pediatrics* 66, 758-762.
98. Petersdorf,E.W., Longton,G.M., Anasetti,C., Mickelson,E.M., McKinney,S.K., Smith,A.G., Martin,P.J., and Hansen,J.A. (1997). Association of HLA-C Disparity With Graft Failure After Marrow Transplantation From Unrelated Donors. *Blood* 89, 1818-1823.
99. Polic,B., Hengel,H., Krmpotic,A., Trgovcich,J., Pavic,I., Lucin,P., Jonjic,S., and Koszinowski,U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1047-1054.
100. Pourgheysari,B., Piper,K.P., McLarnon,A., Arrazi,J., Bruton,R., Clark,F., Cook,M., Mahendra,P., Craddock,C., and Moss,P.A.H. (2008). Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 43, 853-861.
101. Prentice,H.G. (1983). A review of the current status and techniques of allogeneic bone marrow transplantation for treatment of leukaemia. *J Clin Pathol* 36, 1207-1214.

102. Prince,A.M., Szmunes,W., Millian,S.J., and David,D.S. (1971). Serologic Study of Cytomegalovirus Infections Associated with Blood Transfusions. *New England Journal of Medicine* 284, 1125-&.
103. Raanani,P., Gafter-Gvili,A., Paul,M., Ben Bassat,I., Leibovici,L., and Shpilberg,O. (2009). Immunoglobulin Prophylaxis in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 27, 770-781.
104. Raghavan,M. and Bjorkman,P.J. (1996). Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 181-220.
105. Rapp,M., Messerle,M., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1993). In vivo protection studies with MCMV glycoprotein gB and gH expressed by vaccinia virus . *Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease* 327-332.
106. Rauser,G., Einsele,H., Sinzger,C., Wernet,D., Kuntz,G., Assenmacher,M., Campbell,J.D.M., and Topp,M.S. (2004). Rapid generation of combined CMV-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 103, 3565-3572.
107. Reddehase,M.J., Balthesen,M., Rapp,M., Jonjic,S., Pavic,I., and Koszinowski,U.H. (1994). The Conditions of Primary Infection Define the Load of Latent Viral Genome in Organs and the Risk of Reccurent Cytomegalovirus Disease. *Journal of Experimental Medicine* 179, 185-193.
108. Reddehase,M.J., Mutter,W., Munch,K., Buhring,H.J., and Koszinowski,U.H. (1987). Cd8-Positive Lymphocytes-T Specific for Murine Cytomegalovirus Immediate-Early Antigens Mediate Protective Immunity. *J. Virol.* 61, 3102-3108.
109. Reeves,M.B., Macary,P.A., Lehner,P.J., Sissons,J.G.P., and Sinclair,J.H. (2005). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4140-4145.
110. Rentenaar,R.J., Gamadia,L.E., van der Hoek,N., van Diepen,F.N.J., Boom,R., Weel,J.F.L., Wertheim-van Dillen,P.M.E., van Lier,R.A.W., and ten Berge,I.J.M. (2000). Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Investigation* 105, 541-548.
111. Reyman,T.A. (1966). Postperfusion Syndrome - A Review and Report of 21 Cases. *American Heart Journal* 72, 116-&.
112. Ribbert,D. (1904). Uber protozoenartige zellen in der niere eines syphilitischen neugoborenen und in der parotis von kindern. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 15, 945-948.
113. Schmitz,H. and Essuman,S. (1986). Comparison of the Neutralizing and Elisa Antibody-Titers to Human Cytomegalovirus (Hcmv) in Human-Sera and in Gamma-Globulin Preparations. *Journal of Medical Virology* 20, 177-182.
114. Schoppel,K., Schmidt,C., Einsele,H., Hebart,H., and Mach,M. (1998). Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases* 178, 1233-1243.

115. Shanley,J.D., Jordan,M.C., and Stevens,J.G. (1981). Modification by Adoptive Humoral Immunity of Murine Cytomegalovirus-Infection. *Journal of Infectious Diseases* 143, 231-237.
116. Shopes,B., Weetall,M., Holowka,D., and Baird,B. (1990). Recombinant Human Igg1-Murine Ige Chimeric Ig - Construction, Expression, and Binding to Human Fc-Gamma Receptors. *Journal of Immunology* 145, 3842-3848.
117. Sinclair,J. and Sissons,P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* 87, 1763-1779.
118. Sindre,H., Tjonnfjord,G.E., Rollag,H., RannebergNilsen,T., Veiby,O.P., Beck,S., Degre,M., and Hestdal,K. (1996). Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88, 4526-4533.
119. Slobedman,B. and Mocarski,E.S. (1999). Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* 73, 4806-4812.
120. Smith,K.M., Pottage,L., Thomas,E.R., Leishman,A.J., Doig,T.N., Xu,D., Liew,F.Y., and Garside,P. (2000). Th1 and Th2 CD4+ T Cells Provide Help for B Cell Clonal Expansion and Antibody Synthesis in a Similar Manner In Vivo. *J Immunol* 165, 3136-3144.
121. Soiffer,R.J. (2004). Preface. In *Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies*, (Totowa, New Jersey: Humana Press), p. v.
122. Sokos,D.R., Berger,M., and Lazarus,H.M. (2002). Intravenous immunoglobulin: Appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 8, 117-130.
123. Stagno,S. (2001). Cytomegalovirus. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* 389-424.
124. Stagno,S., Reynolds,D.W., Amos,C.S., Dahle,A.J., McCollister,F.P., Mohindra,I., Ermocilla,R., and Alford,C.A. (1977). Auditory and Visual Defects Resulting from Symptomatic and Subclinical Congenital Cytomegaloviral and Toxoplasma Infections. *Pediatrics* 59, 669-678.
125. Storek,J. and Saxon,A. (1992). Reconstitution of B-Cell Immunity Following Bone-Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 9, 395-408.
126. Tay,C.H., Szomolanyi-Tsuda,E., and Welsh,R.M. (1998). Control of infections by NK cells. Specificity, Function, and Development of Nk Cells 230, 193-220.
127. Taylorwiedeman,J., Sissons,J.G.P., Borysiewicz,L.K., and Sinclair,J.H. (1991). Monocytes Are A Major Site of Persistence of Human Cytomegalovirus in Peripheral-Blood Mononuclear-Cells. *Journal of General Virology* 72, 2059-2064.
128. Teshima,T. and Ferrara,J.L.M. (2004). Pathophysiology of Acute Graft-vs-Host Disease. In *Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies*, (Totowa, New Jersey: Humana Press), pp. 135-136.
129. van de Winkel,J.G.J. and Anderson,C.L. (1991). Biology of Human Immunoglobulin-G Fc-Receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 49, 511-524.

130. Van,V., Van Den,H., and Van DE,W. (1998). FcRIa-chain complexes trigger antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in CD5 Bcell/macrophage IIA1.6 cells. *Clinical & Experimental Immunology* *113*, 415-422.
131. Waldrop,S.L., Davis,K.A., Maine,V.C., and Picker,L.J. (1998). Normal human CD4(+) memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *Journal of Immunology* *161*, 5284-5295.
132. Williamson,W.D., Desmond,M.M., LaFevers,N., Taber,L.H., Catlin,F.I., and Weaver,T.G. (1982). Symptomatic Congenital Cytomegalovirus: Disorders of Language, Learning, and Hearing. *Archives of Pediatrics Adolescent Medicine* *136*, 902-905.
133. Wills,M.R., Carmichael,A.J., Mynard,K., Jin,X., Weekes,M.P., Plachter,B., and Sissons,J.G.P. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: Frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. Virol.* *70*, 7569-7579.
134. Wills,M.R., Carmichael,A.J., Sinclair,J.H., and Sissons,J.G.P. (2007). Immunobiology and host response. In *Human Herpesviruses. Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, (Cambridge University Press), p. 788.
135. Wirnsberger,G., Mauric,A., and Holzer,H. (1999). Hyperimmune Globulin Prophylaxis for Cytomegalovirus Infection in Renal Transplantation. *Nephron* *81*, 368-369.
136. Zhou,L., Chong,M.M.W., and Littman,D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* *30*, 646-655.

8 Danksagung

Für die Möglichkeiten, Medizin zu studieren, und für die Geduld möchte ich mich bei meinen Eltern herzlich bedanken. Ich möchte meiner Leiterin im wissenschaftlichen Forschungsinstitut für Hämatologie und Bluttransfusion (Taschkent) und allen meinen Kollegen für die Unterstützung herzlich danken.

Für die allseitige Hilfe und Bemühungen, für die Möglichkeit, an diesem Projekt zu arbeiten bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hartmut Hengel. Ich bedanke mich bei dem Deutschen akademischen Austauschdienst für das Stipendium und die Möglichkeit, an diesem Programm teil zu nehmen.

Besonders möchte ich mich bei der ganzen CMV-Arbeitsgruppe bedanken, wo ich nicht nur an meinem Projekt arbeiten konnte, sondern auch allgemeine Prinzipien der Forschung gelernt habe. Vielen Dank sage ich Albert für die interessante Einführung in die Virologie und für seine Geduld. Für meine ersten Schritte in Zellkultur bin ich Manu und Anne sehr dankbar. Mein Dank geht an Eugi und Henrike–ohne ihre Hilfe beim Lernen der Methoden, auf denen der Hauptteil meiner Arbeit basiert, wäre die Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen.

Für die Hilfe, Zeit und Geduld bei der Auswertung der Daten, Planung der Experimenten und Korrekturen meiner Doktorarbeit möchte ich mich herzlich bei Mirko bedanken. Ich möchte mich bei Khanh, Stef und Alex für die Einführung in die Stockherstellung bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Ratschläge und Ideen, Kritik und motivierenden Worte.

Beim ganzen Team der Diagnostik–Ortwin, Amei, Linda und allen MTAs möchte ich mich für die Vorbereitung der Proben von Patienten, Einführung in die diagnostischen Methoden und enge Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an unsere Mitarbeiter, die so nett waren, mehrmals Blut abzugeben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Cramer für ihre Hilfe bei den ersten Korrekturen meiner Dissertation.

Dank der Hilfe unserer Kooperationspartner – Dr. Guido Kobbe, Dr. Nelly Nancy Safaian, Dr. Roland Fenk–aus der Klinik der Hämatologie, Onkologie und Klinischen Immunologie der HHU konnte ich mit klinischen Daten von den untersuchten Patienten arbeiten und bekam immer erschöpfende Antworten auf meine Fragen.

Ich bedanke mich bei allderen, die in dieser Zeit nicht mit mir waren, an mich dachten und auf mich gewartet haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Enver Aliyev
Postanschrift	Fabriciusstraße, 8, 40225 Düsseldorf
Geburtsdatum	18.08.1977
Geburtsort	Usbekistan, Taschkent Region

Schulausbildung:

1984 – 1992	Abschluss – Zeugnis über der unvollständigen Mittelschulbildung Deutsch als Fremdsprache (5 Jahre)
-------------	---

Fachschule:

1992 – 1996	Landwirtschaftskolleg, Abteilung für Veterinärmedizin. Fach- „Veterinärmedizin“. Abschluss – Tierarztassistent
-------------	---

Hochschulausbildung:

1996 – 2003	Erste staatliche medizinische Hochschule, Taschkent, Usbekistan. Fach „Allgemeine Medizin“. Abschluss – Allgemein-Arzt
2003 – 2005	Wissenschaftliches Forschungsinstitut für Hämatologie und Bluttransfusion, Taschkent, Usbekistan. Fach „Hämatologie und Bluttransfusion“ Abschluss – Hämatologe.
2005 – 2006	Wissenschaftliche Abteilung im oben genannten Institut (Tätigkeit im Bereich der klinischen Hämostaseologie).
2006 – 2009	DAAD-Stipendiat, Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität (HHU), Düsseldorf. Durchführung einer klinischen Studie in Kooperation mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie der HHU, Düsseldorf